



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS ROEDORES DAS ESPÉCIES *MUS MUSCULUS* E
RATTUS NORVEGICUS COMO HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS DE
LEISHMANIA INFANTUM NOS CONCELHOS DE SESIMBRA E SINTRA

MARCOS FERREIRA HELHAZAR

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Dr. José Pedro Amaral Leitão

ORIENTADOR

Dr. José Pedro Amaral Leitão

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2012

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA
Faculdade de Medicina Veterinária

AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS ROEDORES DAS ESPÉCIES *MUS MUSCULUS* E
RATTUS NORVEGICUS COMO HOSPEDEIROS RESERVATÓRIOS DE
LEISHMANIA INFANTUM NOS CONCELHOS DE SESIMBRA E SINTRA

MARCOS FERREIRA HELHAZAR

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da Fonseca de Sampaio

Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Dr. José Pedro Amaral Leitão

ORIENTADOR

Dr. José Pedro Amaral Leitão

CO-ORIENTADORA

Doutora Isabel Maria Soares Pereira da
Fonseca de Sampaio

2012

LISBOA

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao projecto PTDC/CVT/118566/2010 e ao CIISA pelo apoio financeiro que tornou este trabalho possível.

À Dr.^a Graça, à direcção e todos os colaboradores da associação “Bianca”, pela preciosa disponibilidade e ajuda.

Ao Geraldo, José Valente, Dr.^a Isabel Peitaca e Rosete pela disponibilidade e pelas visitas guiadas ao albergue de Sintra.

Ao Dr. José Pedro, meu orientador, pela incansável dedicação a este trabalho, pela motivação e pelos preciosos conselhos e ensinamentos durante o estágio curricular.

Ao Dr. Pedro Matias, pelos ensinamentos, pela amizade e a motivação que me transmitiu durante o estágio e a elaboração deste trabalho.

À Prof. Isabel Fonseca por todo o apoio, a confiança e o infindável estímulo para fazer sempre mais e melhor.

Ao Prof. Luís Carvalho pela sempre boa disposição, pelos preciosos conselhos e pelo apoio ao diagnóstico laboratorial.

À Lídia e a todos os colegas do sector de Parasitologia, por toda a ajuda e apoio nas execuções práticas laboratoriais.

Aos Profs. Luís Tavares e Ana Duarte pelo apoio ao diagnóstico molecular e à Sandra pelo apoio ao diagnóstico histopatológico.

Ao Doutor Alexandre Leitão, pelos conselhos, simpatia e boa disposição.

Ao Dr. Papadogiannakis, Dr. Dimosthenis, Dr. Pourmohammadi o envio dos seus artigos e especialmente ao Dr. Gradoni, que enviou os seus artigos por correio após viajar em urgência

de Itália para a Turquia. Estarei eternamente em dívida e este trabalho é em muito, dedicado a ele.

Aos meus colegas de curso dos dois primeiros anos nos Açores.

Por fim à minha Mãe e irmãs, ao Carlos e à Dina, à minha companheira Marta e aos meus animais de estimação pelas verdadeiras e incondicionais manifestações de verdadeira amizade e apreço.

RESUMO

Avaliação do papel dos roedores das espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* como hospedeiros reservatórios de *Leishmania infantum* nos concelhos de Sesimbra e Sintra.

A leishmaniose causada por *Leishmania infantum* é uma doença parasitária de cariz zoonótico transmitida por insectos flebotómicos, os seus vectores biológicos. O principal hospedeiro definitivo é o cão embora sejam reconhecidos hospedeiros reservatórios que promovem a manutenção do agente nos ciclos doméstico e silvestre.

Este trabalho reporta pela primeira vez, evidências de infecção por *Leishmania* sp. em roedores silvestres das espécies *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* capturados em dois canis dos concelhos de Sintra e de Sesimbra.

Num total de 30 animais testados, através do método de *Real Time-PCR*, 33,3% (9/27) dos espécimes de *Mus musculus* revelaram presença de ADN de *Leishmania* sp., enquanto no exame parasitológico e histopatológico, a taxa de infecção por formas amastigotas do parasita foi, simultaneamente, de 18,5% (5/27). Para a espécie *Rattus norvegicus* a taxa de infecção foi de 33,3% (1/3), apurada através de exame parasitológico.

Dos roedores estudados, apenas um animal foi positivo pelos três métodos em simultâneo.

Ambas as espécies testadas são hospedeiros reservatórios viáveis e susceptíveis e constituem risco acrescido de transmissão da infecção a canídeos e seres humanos nos meios peri-domiciliário e intra-domiciliário. Medidas eficientes de controlo de roedores devem ser instituídas em canis e em todos os locais de risco como forma de prevenção da infecção dos flebótomos e consequente transmissão do parasita.

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose, roedores, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*.

ABSTRACT

Evaluation of the rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* as reservoir hosts for *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra.

Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* is a parasitic zoonotic disease transmitted by sandflies, its biological vectors. The domestic dog is the main host, but other reservoir hosts are known to maintain the disease in both domestic and sylvatic cycles.

For the first time, evidence of *Leishmania* sp. infection in wild rodents of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus* species captured in two kennels of Sintra and Sesimbra is presented.

Of 30 rodents tested, by Real time-PCR, 33,3% (9/27) of the *Mus musculus* rodents revealed presence of *Leishmania* sp. DNA, while 18,5% (5/27) were positive for the presence of *Leishmania* amastigotes in the parasitological and histopathological analysis. Of the *Rattus norvegicus* species, 33,3% (1/3) revealed infection by parasitological analysis.

Off the 30 studied rodents, only one was positive by all three methods simultaneously.

Both studied species, being viable and susceptible hosts, increase the risk of dog and human infection in households and surrounding areas. Efficient rodent control measures should be implemented in kennels and all risk zones to prevent the infection transmission.

Keywords: *Leishmania*, leishmaniasis, rodents, *Rattus norvegicus*, *Mus musculus*.

Índice geral

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
Índices.....	v
1. Introdução.....	1
1.1. Estágio curricular.....	1
2. Monografia sobre leishmaniose.....	6
2.1. Etiologia.....	6
2.2. Morfologia.....	7
2.3. Ciclo de vida.....	8
2.4. O vector.....	9
2.5. O hospedeiro.....	12
2.5.1. O cão.....	12
2.5.2. O Homem.....	13
2.5.3. Outros hospedeiros.....	15
2.6. Epidemiologia.....	17
2.6.1. Transmissão.....	17
2.6.2. Importância da doença.....	17
2.6.2.1. Importância da doença no cão.....	17
2.6.2.2. Importância da doença no Homem.....	19
2.6.3. Factores de risco.....	20
2.7. Diagnóstico.....	20
2.7.1. Diagnóstico parasitológico e molecular.....	20
2.7.2. Diagnóstico serológico.....	21
2.8. Medidas de prevenção e controlo.....	21
2.8.1. Medidas de prevenção e controlo no cão.....	21
2.8.1.1. Vacinação.....	22
2.8.2. Medidas de prevenção e controlo no Homem.....	22
3. Infecção por <i>Leishmania</i> em roedores silvestres.....	23
3.1. Introdução.....	23
3.2. Estudos de infecção natural por <i>Leishmania</i> em roedores silvestres.....	23
3.2.1. Brasil.....	23
3.2.1.1. Estado de Minas Gerais.....	23
3.2.1.1.1. Ponte Do Gravatá.....	23
3.2.1.1.2. Cidade de Belo Horizonte 2005.....	24
3.2.1.1.3. Cidade de Belo Horizonte 2008.....	24
3.2.1.2. Estado de Pernambuco.....	25
3.2.1.2.1. Município de Imbú.....	25
3.3. Venezuela.....	26
3.3.1. Estado de Anzoátegui.....	26
3.3.2. Estado de Lara.....	27
3.4. México.....	27
3.4.1. Estado de Campeche.....	27
3.5. Chipre.....	29
3.6. Itália.....	30
3.6.1. Calábria e Sicília.....	30
3.7. Grécia.....	31
3.7.1. Atenas e Píreus.....	31
3.8. Irão.....	31

3.8.1. Totalidade da República iraniana.....	31
3.8.2. Norte iraniano.....	33
3.8.3. Sul iraniano.....	34
3.8.3.1. Província de Fars 2010.....	34
3.8.3.2. Província de Fars 2011.....	34
3.8.4. Centro iraniano.....	35
4. Estudos de infecção experimental por <i>Leishmania</i> em roedores silvestres.....	37
4.1. Itália.....	37
4.1.1. Ensaio 1.....	37
4.1.2. Ensaio 2.....	38
4.2. Turquia.....	39
5. Avaliação do papel dos roedores das espécies <i>Mus musculus</i> e <i>Rattus norvegicus</i> como hospedeiros reservatórios de <i>Leishmania infantum</i> nos concelhos de Sesimbra e Sintra.....	42
5.1. Objectivos.....	42
5.2. Material e métodos.....	42
5.2.1. Material.....	42
5.2.1.1. Biologia dos roedores.....	42
5.2.1.1.1. <i>Rattus norvegicus</i>	42
5.2.1.1.2. <i>Mus musculus</i>	43
5.2.1.2. Caracterização dos locais de recolha da amostra.....	44
5.2.1.2.1. Canil de Meleças.....	44
5.2.1.2.2. Canil de Sesimbra.....	45
5.2.1.3. Caracterização do clima dos concelhos de Sintra e de Sesimbra.....	46
5.2.2. Métodos.....	47
5.2.2.1. Exame de necropsia e recolha de material biológico.....	47
5.2.2.2. Caracterização das populações em estudo.....	48
5.2.2.3. RT-PCR.....	51
5.2.2.3.1. Extracção de ADN.....	51
5.2.2.3.2. Quantificação de ADN.....	51
5.2.2.3.3. Realização do RT-PCR.....	51
5.2.2.4. Exame parasitológico.....	52
5.2.2.5. Exame histopatológico.....	52
5.2.2.5.1. Cortes histológicos corados com Giemsa.....	52
5.2.2.5.2. Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina.....	53
6. Resultados.....	54
6.1. RT-PCR.....	54
6.2. Exame parasitológico.....	56
6.3. Exame histopatológico.....	58
6.4. Resultados globais.....	60
7. Discussão.....	61
8. Conclusão.....	68
Bibliografia.....	70

Índice de tabelas

Tabela 1 - Espécies de <i>Leishmania</i> infectantes para canídeos e roedores e sua data de descoberta.....	6
Tabela 2 - Espécies de vectores e <i>Leishmania</i> no Novo e no Velho Mundo, e distribuição geográfica.....	11
Tabela 3 - Prevalências para leishmaniose canina em 2009 em 18 distritos de Portugal...	18
Tabela 4 - Sero-prevalência de <i>Leishmania infantum</i> em roedores no Chipre em função da localidade e época do ano.....	30
Tabela 5 - Espécies de <i>Leishmania</i> isoladas em roedores provenientes de áreas endémicas de leishmaniose cutânea.....	32
Tabela 6 - Espécies de <i>Leishmania</i> isoladas em roedores provenientes de áreas endémicas de leishmaniose visceral.....	33
Tabela 7 - Tecidos positivos para <i>Leishmania major</i> nas espécies <i>Meriones persicus</i> , <i>Tatera indica</i> , <i>Mus musculus</i> e <i>Meriones libycus</i>	35
Tabela 8 - Prevalências, espécies de roedores e espécies de <i>Leishmania</i> nos estudos de infecção natural compilados.....	36
Tabela 9 - Percentagem de infecção em <i>Phlebotomus sergenti</i> após alimentação nos locais de inoculação em <i>Rattus rattus</i>	40
Tabela 10 - Carga parasitária no pavilhão auricular inoculado em diferentes intervalos de tempo.....	41
Tabela 11 - Carga parasitária nas amostras de pavilhão auricular dos animais positivos por RT-PCR.....	56
Tabela 12 - Resultados globais da pesquisa de <i>Leishmania</i> sp. nos roedores das espécies <i>Rattus norvegicus</i> e <i>Mus musculus</i> provenientes dos canis dos concelhos de Sintra e Sesimbra.....	61

Índice de gráficos

Gráfico 1 - Percentagens relativas aos diferentes tipos de manifestações de doença observadas em cães durante o estágio curricular.....	4
Gráfico 2 - Percentagens relativas aos diferentes tipos de manifestações de doença observadas em gatos durante o estágio curricular.....	5
Gráfico 3 - Proveniência da totalidade da amostra de roedores por concelho.....	48
Gráfico 4 - Distribuição por sexo na totalidade da amostra.....	49
Gráfico 5 - Distribuição por sexo na amostra da espécie <i>Mus musculus</i>	49
Gráfico 6 - Distribuição por sexo na amostra da espécie <i>Rattus norvegicus</i>	49
Gráfico 7 - Classificação do escalão etário da totalidade da amostra.....	50
Gráfico 8 - Classificação do escalão etário na amostra de <i>Mus musculus</i>	50
Gráfico 9 - Classificação do escalão etário na amostra de <i>Rattus norvegicus</i>	50
Gráfico 10 - Taxa de infecção obtida por RT-PCR nos roedores testados.....	54
Gráfico 11 - Escalão etário dos roedores positivos por RT-PCR.....	54
Gráfico 12 - Taxa de infecção obtida por RT-PCR na pele de pavilhão auricular e baço dos roedores testados.....	55
Gráfico 13 - Taxa de infecção obtida por RT-PCR nas duas espécies de roedores.....	55
Gráfico 14 - Taxa de infecção obtida por RT-PCR na espécie <i>Mus musculus</i>	55

Gráfico 15 - Taxa de infecção no exame parasitológico no total dos roedores testados.....	56
Gráfico 16 - Taxa de infecção por espécie no exame parasitológico.....	57
Gráfico 17 - Escalão etário dos roedores positivos no exame parasitológico.....	57
Gráfico 18 - Presença de formas amastigotas de <i>Leishmania</i> sp. no fígado e baço dos roedores positivos no exame parasitológico.....	58
Gráfico 19 - Taxa de infecção no exame histopatológico no total dos roedores testados...	59
Gráfico 20 - Taxa de infecção por espécie no exame histopatológico.....	59
Gráfico 21 - Presença de <i>Leishmania</i> sp. no fígado e baço dos roedores positivos no exame histopatológico.....	60
Gráfico 22 - Escalão etário dos roedores positivos no exame histopatológico.....	60

Índice de figuras

Figura 1 - Forma promastigota de <i>Leishmania</i>	7
Figura 2 - Forma amastigota de <i>Leishmania</i>	7
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	8
Figura 4 - <i>Phlebotomus perniciosus</i>	10
Figura 5 - <i>Lutzomyia longipalpis</i>	10
Figura 6 - Alopecia peri-ocular e atrofia muscular marcada em Pitbull.....	13
Figura 7 - Úlcera muco-cutânea nasal em Labrador Retriever.....	13
Figura 8 - Onicogribose em Labrador Retriever.....	13
Figura 9 - Epistaxis unilateral esquerda em Malamute do Alasca.....	13
Figura 10 - Leishmaniose cutânea humana.....	14
Figura 11 - Leishmaniose muco-cutânea humana.....	14
Figura 12 - Leishmaniose visceral humana.....	15
Figura 13 - Culturas de <i>Leishmania</i> positivas provenientes de dois animais da espécie <i>Didelphis albiventris</i>	25
Figura 14 - Exemplar da espécie <i>Rattus norvegicus</i>	42
Figura 15 - Exemplar da espécie <i>Mus musculus</i>	43
Figura 16 - Vegetação presente no canil de Meleças.....	44
Figura 17 - Acumulação de água estagnada no canil de Meleças.....	45
Figura 18 - Canil nos arredores de Sesimbra.....	45
Figura 19 - Ambiente circundante do canil localizado nos arredores de Sesimbra.....	46
Figura 20 - Lesão na cauda em espécime de <i>Rattus norvegicus</i>	48
Figura 21 - Lesão na cauda em espécime de <i>Mus musculus</i>	48
Figura 22 - Forma amastigota no exame parasitológico de baço de roedor da espécie <i>Mus musculus</i> na ampliação de 1000x.....	57
Figura 23 - Forma amastigota no exame parasitológico de fígado de roedor da espécie <i>Mus musculus</i> na ampliação de 1000x.....	58
Figura 24 - Formas amastigotas no exame histopatológico de baço de roedor da espécie <i>Mus musculus</i> na ampliação de 1000x.....	59

Índice de anexos

Anexo 1 - Resultados totais do estudo epidemiológico efectuado no Chipre.....	76
Anexo 2 - Dados biométricos dos roedores estudados.....	77
Anexo 3 - Alterações orgânicas detectadas nos roedores estudados.....	80
Anexo 4 - Quantificação de ADN das amostras submetidas a RT-PCR.....	82

Lista de símbolos e abreviaturas

°C - graus Celsius

µl - microlitro

µm - micrómetro

ADN - Ácido desoxirribonucleico

ARN - Ácido ribonucleico

BHI - *Brain-heart infusion*

cm - centímetro

ELISA - *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FAT - *Fluorescence Antibody Test*

g – grama

IFAT - *Indirect Fluorescence Antibody Test*

IgG - imunoglobulina G

kg - quilograma

km - quilómetro

km² - quilómetro quadrado

LPG - lipofosfoglicano

LIT - *Liver infusion broth tryptose*

mg - miligrama

mm - milímetro

ng – nanograma

nM - nanomole

NNN - Novy-McNeil-Nicole

PCR - *Polymerase chain reaction*

RAPD-PCR - *Random amplified polymorphic DNA-Polymerase chain reaction*

RT-PCR - *Real time Polymerase chain reaction*

VIH - Virus da imunodeficiência humana

1. Introdução

1.1. Estágio curricular

O estágio curricular desenvolvido na enfermaria dos cães e dos gatos do albergue da União Zoófila orientado pelo Dr. José Pedro Leitão teve a duração de seis meses, no período diurno perfazendo um total de aproximadamente 700 horas.

Os principais objectivos a cumprir foram:

- Elaboração de exame físico completo de forma sistemática e padronizada;
- Elaboração e discussão de diagnósticos diferenciais;
- Elaboração de planos diagnósticos, através da selecção dos meios auxiliares de diagnóstico;
- Colheita e processamento de amostras para meios auxiliares de diagnóstico, nomeadamente:
 - análises hematológicas (hemograma, esfregaços de sangue);
 - análises bioquímicas (perfil bioquímico sérico, ionograma, perfil hormonal);
 - análises serológicas;
 - urinanálise (sedimento urinário, urina tipo I, urina tipo II e urocultura)
 - análises dermatológicas (raspagem de pele, citologia, cultura microbiológica, exame micológico cultural, biópsia e histopatologia);
 - análise citológica e histopatológica de diversos tecidos e órgãos, utilizando técnicas adequadas a cada caso (ex.: punção aspirativa com agulha fina, citologia por aposição);
- Requisição de exames auxiliares de diagnóstico solicitados a entidades externas à União Zoófila, nomeadamente:
 - radiografias simples e contrastadas (ex.: trânsito baritado e mielografia);
 - electrocardiogramas;
 - ecografias abdominais e cardíacas;
- Interpretação e discussão dos resultados dos exames auxiliares de diagnóstico;
- Elaboração e discussão de planos terapêuticos;
- Elaboração de medidas de controlo, tratamento e erradicação de doenças de grupo;
- Administração de medicamentos, incluindo formas parentéricas e não parentéricas;
- Acompanhamento da evolução dos casos clínicos até ao seu termo;
- Avaliação e discussão dos casos clínicos;
- Abordagem aos temas do comportamento e bem-estar animal;

- Abordagem às técnicas de modulação comportamental em animais com comportamentos desviantes ou problemáticos;
- Abordagem aos temas da adopção e abandono de animais de companhia;
- Abordagem das questões e preocupações higio-sanitárias, de Saúde Pública e ambiental dos albergues de animais domésticos.

Foram também cumpridos os objectivos de fornecer apoio em pequenas cirurgias de tecidos moles, na preparação do paciente, monitorização anestésica, auxílio ao cirurgião e nos cuidados pós-operatórios.

O estágio permitiu uma consolidação do conhecimento adquirido bem como a aplicação e adequação desse conhecimento à prática clínica em animais de companhia.

Entre as doenças diagnosticadas são de salientar as mais frequentemente observadas:

No cão:

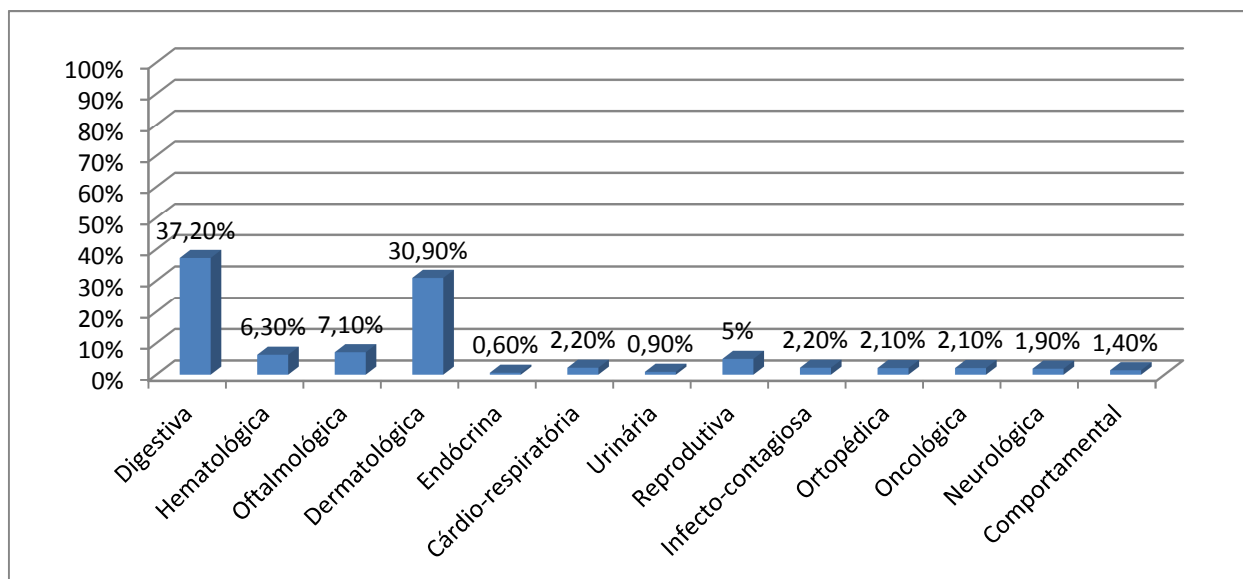
- Do foro digestivo: doença oral (gengivite, estomatite, doença periodontal, abscessos dentários, epúlides), gastrite, enterite, gastroenterite, pancreatite, distúrbios hepato-biliares (hepatite aguda e crónica, neoplasia hepática, *shunt* porto-sistémico);
- Do foro hematológico: Hemoparasitoses (por *Babesia* sp., *Rickettsia* sp., *Ehrlichia* sp.), Linfoma. As manifestações mais frequentes foram anemia (hemolítica, imunomediada ou não imunomediada, ferropriva e normocrómica e normocítica), trombocitopénia, alterações diversas do leucograma bem como distorções do proteinograma;
- Do foro oftalmológico: doença palpebral (blefarite, lacerações, neoplasias, entropion, ectropion, agenésia/atrésia dos pontos lacrimais), doença conjuntival (conjuntivite aguda e crónica), doença corneana (úlceras, queratite, querato-conjuntivite seca, *pannus*, queratite pigmentar), doença uveal (iridociclíte, sinéquias iridocorneanas, hifema), doença do cristalino (catarata incipiente, madura e hipermadura, prolapso anterior e posterior do cristalino), glaucoma unilateral e bilateral;
- Do foro dermatológico: Feridas cutâneas e dos tecidos adjacentes (mordeduras, lacerações, traumatismos), dermatite bacteriana (piodermites nas diversas apresentações superficiais e profundas), fúngica (dermatofitose, onicomicose, malasseziose), parasitária (demodectose localizada e generalizada, dermatite alérgica à picada da pulga, sarna sarcóptica, leishmaniose), alérgica (alimentar, atopia e

dermatite alérgica à picada da pulga), neoplásica (neoplasias cutâneas), otites (bacterianas, fúngicas, parasitárias, neoplásicas, corpo estranho, alérgicas);

- Do foro endócrino: hipotireoidismo, hiperadrenocorticismo, *diabetes mellitus*;
- Do foro cardio-respiratório: Insuficiência cardíaca (esquerda, direita e global, congestiva e não congestiva), traqueobronquite, pneumonia, neoplasia pulmonar metastática, efusão pleural, estenose das narinas;
- Do foro urinário: Insuficiência renal aguda e crónica, infecção do tracto urinário, urolitíase vesical (por cálculos de estruvite);
- Do foro reprodutivo: endometrite, hiperplasia quística do endométrio, piómetra (aberta e fechada), pseudociese, sarcoma de Sticker, prolapso vaginal, hiperplasia vaginal, tumor testicular, criptorquidismo unilateral e bilateral, hipertrofia prostática benigna, priapismo;
- Do foro infecto-contagioso viral: parvovirose, esgana, traqueobronquite infecciosa canina, hepatite de Rubarth;
- Do foro ortopédico: artroses, fracturas, artrite infecciosa, raquitismo, luxação, ruptura de ligamentos cruzados do joelho;
- Do foro neurológico: síndrome vestibular central e periférica, cegueira, doença da medula espinal, epilepsia, encefalopatia hepática;
- Do foro oncológico: tumores cutâneos, mamários, testiculares, orais, hepáticos, esplénicos, intra-abdominais múltiplos/difusos, linfoma cutâneo e multicêntrico, tumor retrobulbar, tumor ósseo, carcinoma espinocelular cutâneo, adenoma das glândulas apócrinas adanaís, neoplasia vesical, sarcoma de Sticker;
- Do foro comportamental: distúrbios do processo de sociabilização, agressividade, comportamentos obsessivos/compulsivos, ansiedade de separação, distúrbios resultantes da sobrepopulação e falta de enriquecimento ambiental.

As percentagens relativas aos diferentes tipos de manifestações de doença observadas em cães estão representadas no gráfico 1.

Gráfico 1 – Percentagens relativas aos diferentes tipos de manifestações de doença observadas em cães durante o estágio curricular.

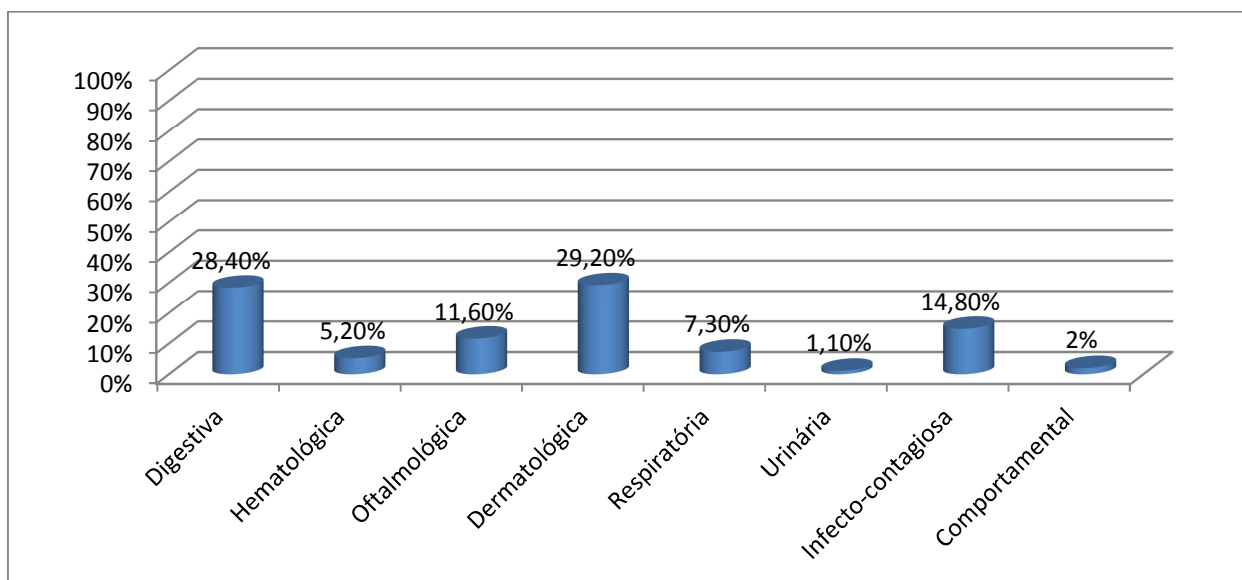


No gato:

- Do foro digestivo: parasitismo gastro-intestinal, enterite, impatações intestinais por corpos estranhos *cat litter*;
- Do foro hematológico: Anemia Infecciosa Felina (*Mycoplasma haemofelis*), anemia secundária a FIV e FeLV;
- Do foro oftalmológico: malformações oftalmológicas congénitas, conjuntivite, manifestações secundárias a complexo coriza com quimose, úlcera da córnea, opacidade da córnea, queratite pigmentar, sinéquias iridocorneanas, *bulbis phtysis*, perda total do globo ocular, cegueira;
- Do foro dermatológico: Feridas cutâneas e dos tecidos adjacentes (mordeduras, lacerações, esfacelos, traumatismos), dermatofitose localizada e generalizada, otocariose, ecto-parasitismo por *Ctenocephalides* sp;
- Do foro respiratório: complexo coriza;
- Do foro urinário: insuficiência renal crónica;
- Do foro infecto-contagioso: FIV, FeLV, PIF, panleucopénia felina, micoplasmose, coriza;
- Do foro comportamental: distúrbios do processo de socialização, agressividade, comportamentos obsessivos/compulsivos, distúrbios resultantes da sobre população e falta de enriquecimento ambiental.

As percentagens relativas aos diferentes tipos de manifestações de doença observadas em cães estão representadas no gráfico 2.

Gráfico 2 - Percentagens relativas aos diferentes tipos de manifestações de doença observadas em gatos durante o estágio curricular.



A Leishmaniose é uma doença endémica na população de canídeos da União Zoófila e o aparecimento de novos casos de doença foi frequente durante o curso do estágio curricular. A presença de uma população de roedores no canil despoletou a curiosidade acerca da possibilidade de poderem constituir hospedeiros reservatórios para *Leishmania infantum*.

2. Monografia sobre leishmaniose

2.1. Etiologia

A leishmaniose é uma doença de cariz zoonótico causada por um protozoário intra-celular da ordem Kinetoplastida e da família Trypanosomatidae, transmitido ao hospedeiro vertebrado por insectos da ordem Diptera, família Psycodidae e sub-família Phlebotominae. Estes diferem no género conforme a localização no Velho Mundo (género *Phlebotomus*) ou no Novo Mundo (género *Lutzomyia*).

Existem várias espécies do género *Leishmania* e a sua distribuição é cosmopolita, exceptuando a Austrália e a Antárctida (Rolão, 2004).

Segundo Shaw (1994), diferentes grupos de características podem ser utilizadas para identificar e classificar as diferentes espécies: morfologia, padrões de desenvolvimento no vector e no hospedeiro, especificidade do hospedeiro, tipagem isoenzimática, estrutura proteica, entre outras.

Existem trinta espécies do género *Leishmania* agrupadas em dois sub-géneros: o sub-género *Leishmania* (L.) no Novo e Velho Mundo e o sub-género *Viannia* (V.) no Novo Mundo. Na Tabela 1 estão representadas as espécies infectantes para canídeos e roedores, assim como a sua data de descoberta.

Tabela 1 – Espécies de *Leishmania* infectantes para canídeos e roedores e sua data de descoberta (baseado em Shaw, 1994; Rolão, 2004; Gramiccia & Gradoni, 2005).

Velho Mundo			Novo Mundo		
Espécie	Data	Hospedeiros	Espécie	Data	Hospedeiros
			<i>L. (L.) chagasi</i>	1937	Cão
			<i>L. (V.) lainsoni</i>	1987	Roedores
<i>L. (L.) tropica</i>	1906	Cão, roedores	<i>L. (L.) mexicana</i>	1953	Cão, roedores
<i>L. (L.) infantum</i>	1909	Cão, roedores	<i>L. (L.) amazonensis</i>	1972	Roedores
<i>L. (L.) major</i>	1914	Roedores	<i>L. (V.) braziliensis</i>	1911	Cão, roedores
			<i>L. (V.) guyanensis</i>	1954	Roedores
			<i>L. (V.) panamensis</i>	1972	Cão, roedores
			<i>L. (V.) braziliensis</i>	1911	Cão, roedores

O critério de diferenciação dos géneros tem como base as diferenças no desenvolvimento do parasita no interior do vector. Estas diferenças não dependem da espécie do vector, mas sim da espécie de *Leishmania*. O padrão de desenvolvimento no sub-género *Leishmania* é supra-pilárico, isto é, após a refeição de sangue, o parasita migra da região posterior do estômago

para a região anterior. No padrão de desenvolvimento peri-pilárico que ocorre no sub-gênero *Viannia*, o parasita penetra no intestino posterior antes de migrar para a porção anterior do estômago (Shaw, 1994).

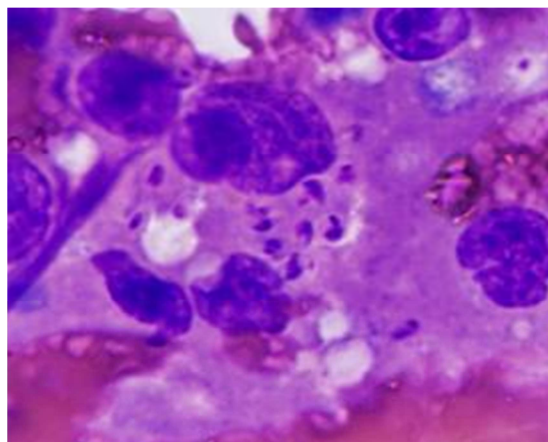
2.2. Morfologia

No seu ciclo de vida heteroxeno em que parte do seu desenvolvimento ocorre num hospedeiro invertebrado, o protozoário apresenta duas formas distintas. A forma promastigota (Figura 1), extra-celular, fusiforme e com cerca de 15 x 3 μm , possui um flagelo de comprimento variável que pode atingir os 20 μm e encontra-se no insecto vector. A forma amastigota (Figura 2), intracelular, ovóide, com um flagelo rudimentar e cinetoplasto possui uma dimensão de 2 x 4 μm aproximadamente e encontra-se no hospedeiro definitivo (Tomás & Romão, 2008).

Figura 1 - Forma promastigota de *Leishmania* (original).



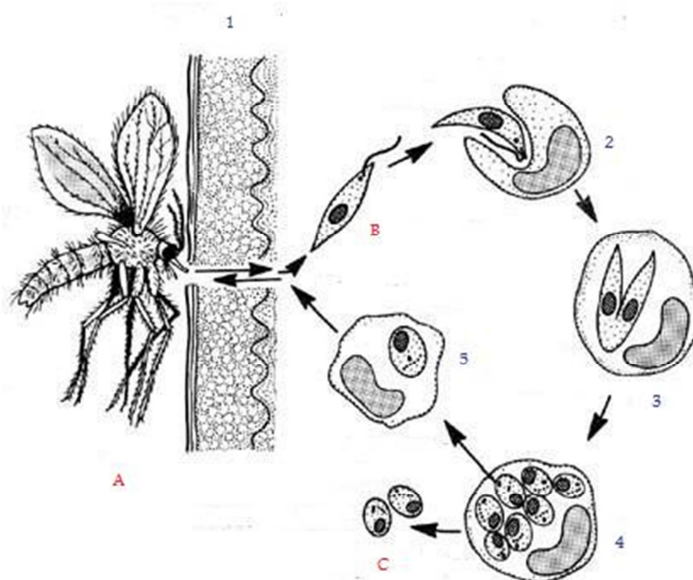
Figura 2 - Forma amastigota de *Leishmania* (original).



2.3. Ciclo de vida

O ciclo de vida do protozoário (Figura 3) inicia-se com a picada da fêmea do insecto vector no hospedeiro vertebrado infectado e com a ingestão de sangue contendo formas amastigotas.

Figura 3 – Ciclo de vida de *Leishmania* (fonte: <http://www.vet.uga.edu/vpp/clerk/joiner/>, 2005).



Legenda: A - Flebótomo, B - Promastigota, C - Amastigota, 1 - Picada no hospedeiro, 2 - Fagocitose e internalização no macrófago, 3 - Diferenciação da forma promastigota em amastigota, 4 - Replicação de amastigotas no interior do macrófago, 5 - Infecção de outros macrófagos após lise celular e infecção do vector.

Seis a dez dias após a refeição, as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas metacíclicos infectantes para o hospedeiro vertebrado e são inoculadas com a saliva aquando da picada.

Numa primeira fase após a ingestão, na membrana peritrófica localizada no intestino médio, os amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicos (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Esta membrana peritrófica não celular constituída por quitina, proteínas e proteoglicanos, separa fisicamente o lumén do epitélio intestinal e é sintetizada por este, como resposta à distensão abdominal após a refeição de sangue. Tem como função a protecção do epitélio contra agentes patogénicos e contra o efeito abrasivo das partículas alimentares (Sádlová & Volf, 2009). Pimenta, Modi, Pereira, Shahabuddin & Sacks, (1997), sugeriram também como função, a protecção contra o ataque enzimático proteolítico em fases iniciais vulneráveis do desenvolvimento do parasita.

Após o primeiro ciclo de replicação dos promastigotas procíclicos e 48-72h depois da refeição, estes promastigotas procíclicos originam os promastigotas nectomonas. Estas formas

iniciam a migração do intestino posterior para uma parte mais anterior do intestino médio. Por acção de quitinases segregadas pelo vector e pelo parasita, a membrana peritrófica é desintegrada e absorvida e os nectomonas aderem através do flagelo à parede intestinal de forma a impedir a sua expulsão com as fezes (Afonso & Alves-Pires, 2008). Esta adesão é promovida por um glicocálix protector constituído por lipofosfoglicanos (LPG) que envolve toda a célula incluindo o flagelo. Polimorfismos neste glicocálix ditam também diferenças na adesão e a exclusividade na relação vector e espécie de *Leishmania* que alberga (Pimenta, Saraiva, Rowton, Modi, Garraway, Beverley, Turco & Sacks, 1994). Adicionalmente, proteínas específicas também estão na origem desta adesão em vectores das espécies *Lutzomyia intermedia* e *Lutzomyia whitmani* na transmissão da espécie *Leishmania braziliensis* (Alves, Cortes & Reginaldo, 2010).

Nos quatro a sete dias após a ingestão desenvolvem-se as formas leptomonas, mais curtas. Ocorre então diferenciação em duas diferentes formas: as formas haptomonas e promastigotas metacíclicos. Os haptomonas fixam-se à válvula estemodeal. Sete a dez dias após a refeição provocam a degenerescência desta, promovendo a migração dos promastigotas metacíclicos para a cavidade oral do insecto (Afonso & Alves-Pires, 2008).

Os promastigotas metacíclicos, as formas infectantes, após a inoculação são posteriormente fagocitadas pelas células dendríticas, neutrófilos e pelos macrófagos da pele do hospedeiro vertebrado e diferenciam-se em amastigotas após a internalização. Tem sido estudada e aprofundada a importância do papel dos neutrófilos nas fases iniciais da infecção por *Leishmania*. A importância destes polimorfo-nucleados nas fases iniciais da inflamação poderá estar intimamente relacionada com a evolução do protozoário. Com efeito, baseando-se na viabilidade dos amastigotas após a fagocitose pelos neutrófilos, diversos autores sugerem que estas células actuam como protecção transitória durante as primeiras horas pós-inoculação, até os macrófagos constituírem a população dominante no infiltrado celular (Charmoi, Auderset, Allebach, & Tacchini-cottier, 2010). Os macrófagos são as células hospedeiras definitivas e responsáveis pela replicação e disseminação do parasita. É nestas células que os amastigotas se replicam e saem por exocitose ou lise celular para o exterior, infectando outros macrófagos.

2.4. O vector

Os flebótomos vivem em diversos habitats, predominando em regiões tropicais e subtropicais. No Velho Mundo (Género *Phlebotomus* - Figura 4) distribuem-se por zonas áridas, semi-áridas e temperadas, enquanto no Novo Mundo (Género *Lutzomyia* – Figura 5) se encontram em zonas florestais.

Figura 4 – *Phlebotomus perniciosus* (fonte: http://diptera.info/photogallery.php?photo_id=4790).



Figura 5 – *Lutzomyia longipalpis* (Fonte: http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html).



Locais escuros com temperatura e humidade elevadas como fendas em paredes e tocas de roedores são propícios. Detritos orgânicos como fezes, restos de plantas, folhas em decomposição e águas estagnadas são locais preferenciais para a reprodução e postura, devido às necessidades de matéria orgânica e de humidade para a alimentação, sobrevivência e desenvolvimento das larvas.

São fracos voadores, não conseguindo contrariar o vento e viajam sempre por curtas distâncias, nunca se afastando muito dos seus locais de reprodução (Sharma & Singh, 2008). A duração do seu ciclo de vida é variável, dependendo da temperatura, humidade e fotoperíodo. Em condições laboratoriais, o ciclo de vida de *Phlebotomus perniciosus* tem a duração aproximada de 45 dias.

Têm aproximadamente dois a três milímetros de comprimento e o corpo e asas cobertos de sedas. O seu organismo é constituído por cabeça, tórax e abdómen. São fitófagos, alimentando-se de sucos e açúcares de plantas, podendo também alimentar-se de outros pequenos insectos como os pulgões (Afonso & Alves-Pires, 2008). No entanto, as fêmeas alimentam-se de sangue, pois necessitam de maior quantidade de proteína do que a disponível nos sucos de plantas para a maturação dos seus ovos e têm, consequentemente, importância no ciclo de transmissão da leishmaniose (Sharma & Singh, 2008). Na cabeça, possuem um

aparelho bucal picador-sugador que utilizam para induzir no hospedeiro vertebrado um micro-hematoma, pelo qual sugam e ingerem o sangue, processo designado por *pool-feeding* (Afonso & Alves-Pires 2008).

Os seus períodos de maior actividade são o crepuscular e o nocturno, durante os meses mais quentes do ano, entre Maio e Outubro, no caso de Portugal. No entanto, com as alterações climáticas, com o aumento da temperatura e com os Invernos menos rigorosos, o ciclo de transmissão poderá estar a sofrer um alongamento sazonal (Campino & Maia, 2010). Na tabela 2, descrevem-se as espécies de flebotomíneos e as espécies de *Leishmania* que podem albergar.

Tabela 2 – Espécies de vectores e *Leishmania* no Novo e no Velho Mundo e distribuição geográfica (baseado em Rolão, 2004; Gramiccia & Gradoni, 2005).

Velho Mundo				Novo Mundo			
Espécie <i>Leishmania</i>	Tipo	Espécie vector	Área geográfica	Espécie <i>Leishmania</i>	Tipo	Espécie vector	Área geográfica
				<i>L. peruviana</i>	Z	<i>Lu. verrucarum</i> <i>Lu. peruensis</i>	Perú
				<i>L. braziliensis</i>	Z	<i>Lu. wellcomei</i>	América Central e do Sul
				<i>L. guyanensis</i>	Z	<i>Lu. umbratilis</i>	América do Sul
<i>L. infantum</i>	Z	<i>Ph. ariasi</i> <i>Ph. perniciosus</i> <i>Ph. Chinensis</i>	Região Mediterrânea, Balcãs, Médio Oriente, Ásia Central, China	<i>L. chagasi</i>	Z	<i>Lu. longipalpis</i> <i>Lu. evansi</i>	América Central e do Sul
<i>L. donovani</i>	A	<i>Ph. argentipes</i> <i>Ph. martini</i> <i>Ph. orientalis</i> <i>Ph. Alexandri</i>	Índia, China, Sudão, Quênia, Paquistão e Etiópia	<i>L. mexicana</i>	Z	<i>Lu. olmeca olmeca</i>	América Central e do Sul
<i>L. tropica</i>	A	<i>Ph. Sergenti</i>	Médio Oriente, Paquistão, Índia, Região Mediterrânea	<i>L. amazonensis</i>	Z	<i>Lu. Flaviscutellata</i>	América Central e do Sul
<i>L. major</i>	Z	<i>Ph. papatasi</i> <i>Ph. duboscqi</i>	Norte, este e oeste África, Médio Oriente e Ásia central	<i>L. panamensis</i>	Z	<i>Lu. panamensis</i> <i>Lu. trapidoi</i> <i>Lu. Gomezi</i>	América Central e do Sul
<i>L. aethiopica</i>	Z	<i>Ph. longipes</i> <i>Ph. pedifer</i>	Etiópia e Quênia	<i>L. venezuelensis</i>	Z	<i>Lu. Rangeliana</i>	Venezuela
				<i>L. lainsoni</i>	Z	<i>Lu. Ubiquitalis</i>	Brasil e Peru
				<i>L. naiffi</i>	Z	<i>Lu. ayrozai</i> <i>Lu. Paraensis</i>	Brasil
				<i>L. shawi</i>	Z	<i>Lu. Whitmani</i>	Brasil

Legenda: Z – Zoonótico; A – Antroponótico.

2.5. O hospedeiro

2.5.1. O cão

O cão é o principal hospedeiro definitivo e reservatório de *Leishmania infantum* (Campino & Maia, 2010). O período de incubação varia entre 3 meses a 7 anos (Center for Food Security and Public Health, 2009). A forma como a doença evolui depende da resposta imunitária de cada animal. Em animais resistentes, o parasita não se dissemina para além do linfonodo eferente, enquanto nos animais susceptíveis ocorre a disseminação dos agentes para vários órgãos como a medula óssea, os linfonodos, a pele, o baço, o fígado e os rins com reacções inflamatórias consequentes (Alexandre-Pires & Correia, 2008). Pode ser sintomático, oligossintomático ou assintomático e apresentar a forma cutânea, a visceral ou ambas.

A forma cutânea caracteriza-se pelo aparecimento de dermatite não-pruriginosa, alopecia ou eritema na zona peri-ocular, (Figura 6) no focinho e nos membros, úlceras muco-cutâneas (Figura 7) e nódulos intra-dérmicos no focinho, pavilhões auriculares externos e face interna das coxas. Pode ocorrer também hiperqueratose digital e nasal, ornicografiose (Figura 8), espessamento e descamação da pele. Infecções bacterianas secundárias são frequentes.

A leishmaniose visceral caracteriza-se por perda de peso com emaciação muscular progressiva (com apetite normal a aumentado), poliúria e polidipsia associadas a insuficiência renal crónica, depressão, vômito, diarreia, tosse, epistaxis (Figura 9), e melena. Achados comuns do exame físico incluem esplenomegália, linfadenopatia, febre, rinite, alterações dermatológicas e uveíte. A nível ocular pode também ocorrer queratite, blefarite ou conjuntivite.

Laboratorialmente podem ocorrer anemia, hiperglobulinémia (normalmente policlonal), hipoalbuminémia, proteinúria, aumento dos níveis séricos das enzimas hepáticas, trombocitopenia, azotémia, linfopenia e leucocitose com desvio à esquerda (Center for Food Security and Public Health, 2009).

Figura 6 – Alopécia peri-ocular e atrofia muscular marcada em Pitbull (cortesia do Dr. José Leitão).

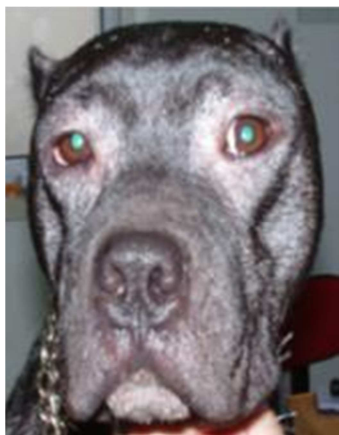


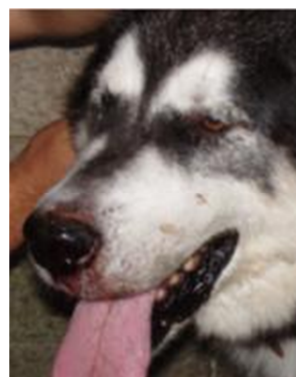
Figura 7 – Úlcera muco-cutânea nasal em Labrador Retriever (cortesia do Dr. José Leitão).



Figura 8 – Onicogribose em Labrador Retriever (cortesia do Dr. José Leitão).



Figura 9 – Epistaxis unilateral esquerda em Malamute do Alasca (cortesia do Dr. José Leitão).



2.5.2. O Homem

O Homem pode sofrer infecção acidental com espécies de *Leishmania* zoonóticas ou pode ser alvo de infecção antroponótica. O período de incubação varia de 1 semana até 3 anos dependendo da espécie envolvida e do tipo de doença resultante. A doença pode manifestar-se desde uma simples úlcera, passando por erosão das mucosas com destruição progressiva da nasofaringe e desfiguração facial, até doença sistêmica fatal. A manifestação clínica resultante depende da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do hospedeiro (Hepburn, 2003). Existem três tipos principais de leishmaniose humana: a cutânea, a muco-cutânea e a visceral.

A leishmaniose cutânea (Figura 10) pode ser localizada ou difusa. Caracteriza-se pelo aparecimento de uma ou mais pápulas não dolorosas, exceptuando casos de infecção bacteriana secundária. Apresentam uma base necrótica e exsudado endurecido que variam entre os 0,5 cm e os 3 cm e que desaparecem após a cura e deixam cicatriz, ou evoluem para úlceras.

Figura 10 – Leishmaniose cutânea humana (fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/cutaneous_leishmaniasis/en/index.html).



Estão descritas a forma localizada em que apenas uma zona está afectada e a forma difusa, mais rara, em que diferentes áreas do corpo apresentam afecção.

A leishmaniose muco-cutânea (Figura 11) assemelha-se à leishmaniose cutânea, embora com afecção da mucosa naso-faríngea meses mais tarde, e com prognóstico mais grave.

Figura 11 – Leishmaniose muco-cutânea humana (fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/mucocutaneous_leishmaniasis/en/index.html).



A leishmaniose visceral (Figura 12) ocorre após a migração do parasita através do sistema macrofágico fagocítico. É a forma mais grave e as manifestações clínicas incluem febre intermitente, hepato-esplenomegália, perda de peso, hemorragias, fadiga e anemia. Foram relatadas recentemente alterações neurológicas numa criança de 16 meses, com perda de tónus muscular, contracções mioclónicas na face e tremores das extremidades (Diniz, Duani, Freitas, Figueiredo & Xavier, 2010). Pacientes com leishmaniose visceral tratados podem mais tarde apresentar sequelas cutâneas. Esta sequela tem o nome de leishmaniose visceral pós Kala-azar e caracteriza-se pelo aparecimento de eritema papular, macular ou maculo-

papular na pele. O eritema inicia-se em redor da cavidade oral e afecta outras partes do corpo, em extensão de forma proporcionalmente directa à gravidade da manifestação clínica. Esta forma de doença ocorre apenas na leishmaniose visceral causada pela espécie com ciclo de transmissão antroponótico, *Leishmania donovani* (Zilstra, Musa, Khalil, El-Hassan & El-Hassan, 2003).

Figura 12 – Leishmaniose visceral humana (fonte: http://www.who.int/leishmaniasis/visceral_leishmaniasis/en/index.html).



2.5.3. Outros hospedeiros

O gato doméstico pode actuar como hospedeiro reservatório assintomático. Um estudo por PCR de sangue circulante realizado em 23 gatos na cidade de Lisboa permitiu chegar a um resultado de 30,4% animais positivos à presença de ADN de *Leishmania infantum*. (Maia, Nunes & Campino, 2008). No entanto em determinadas situações pode evidenciar doença, como foi o caso de um gato macho adulto em São Paulo no Brasil infectado por *Leishmania chagasi* com dermatite extensa, crostas e úlceras no focinho, na face palmar e plantar dos membros (Coelho, Lima, Amarante, Langoni, Pereira, Abdelnour & Bresciani, 2010).

O morcego actua também como hospedeiro reservatório no Novo Mundo. Um estudo realizado demonstrou que espécimes pertencentes a pelo menos três géneros (*Carollia*, *Phyllostoma* e *Rhynophylla*), pertencentes à família *Phyllostomidae*, constituem fonte de alimento para *Lutzomyia longipalpis* no nordeste Venezuelano. Após o isolamento do parasita *Leishmania chagasi*, o isolado foi inoculado em murganhos BALB/C, desenvolvendo estes, lesão cutânea nodular. Os morcegos não apresentavam sinais de doença. No Velho Mundo, devido a estudos inconclusivos, o papel dos morcegos no ciclo continua por apurar (Lima, Rodríguez, Barrios, Ávila, Cañizales & Gutiérrez, 2010).

Em estudos efectuados em galinhas, determinados autores concluíram que esta espécie constitui uma boa fonte de alimento para *Lutzomyia longipalpis*. Em termos nutricionais é comparável ao cão, avaliando pela quantidade de ovos produzidos. Esta foi mais elevada comparada com espécimes que se alimentaram de sangue humano (Sant'Anna, Nascimento,

Alexander, Dilger, Cavalcante, Diaz-Albiter, Bates & Dillon, 2010). Com efeito, esta espécie poderia ter importância como hospedeiro reservatório, uma vez que a actividade nocturna é nula e a pele é fina e facilmente perfurável pela probóscide do insecto. No entanto, a temperatura corporal de 41°C torna esta espécie refractária à infecção, enquanto a ingestão de eritrócitos nucleados por parte do vector despoleta acção enzimática letal para os promastigotas. Apesar destes argumentos, não fica posta de parte a ideia de que a presença de populações de galináceos poderá actuar como atracção para aproximação predatória de animais silváticos, potenciais reservatórios (Alexander, Carvalho, McCallum & Pereira, 2002).

O equino pode contrair leishmaniose cutânea e apresentar lesões, servindo de hospedeiro reservatório para *Leishmania*. Vários casos no Novo Mundo foram reportados envolvendo *Leishmania braziliensis* (Vedovello, Jorge, Lonardoni, Teodoro & Silveira, 2008). No entanto, infecções experimentais com *Leishmania chagasi* realizadas em quatro asininos resultaram em fraca infecção patente, assim como ausência de infecção do flebotomíneo vector. Os autores concluíram assim, que o equino não tem importância como reservatório de espécies causadoras de leishmaniose visceral. No entanto, na ecologia do vector têm importância primordial uma vez que favorecem a alimentação, a reprodução e o aumento da densidade populacional (Cerqueira, Sherlock, Gusmão, Junior & Nakatani, 2003).

No nordeste espanhol, foi efectuado um rastreio serológico para *Leishmania infantum* em cavalos saudáveis. Em 112 testados, 16 tinham sido expostos e apresentaram anticorpos anti-*Leishmania infantum*. Um ensaio de proliferação linfocitária específico foi realizado em 55 cavalos de forma a avaliar a resposta imunitária. Do total de animais testados, 20 apresentaram resposta imunitária celular específica. Os autores concluíram que estes dados aliados à baixa frequência de infecção nestes animais, sugere uma alta eficiência imunológica em debelar infecções por *Leishmania* (Fernández-Bellon, Solano-Gallego, Bardagi, Alberola, Ramis & Ferrer, 2006).

Em Portugal, em 2005, foi detectado um caso de leishmaniose cutânea equina. O animal de 17 anos e raça Anglo-lusitana, apresentava uma lesão ulcerada de 2,5 x 1 cm no metatarso direito (Rolão, Martins, João & Campino, 2005).

2.6. Epidemiologia

2.6.1. Transmissão

Existem dois principais tipos de ciclos de transmissão: o ciclo zoonótico, compreendendo os ciclos silvestre e doméstico, em que a infecção ocorre no cão (ciclo de transmissão doméstico) ou em reservatórios silvestres (ciclo de transmissão silvestre) e em que o homem é hospedeiro acidental ocasional; e o antroponótico, em que o homem é o hospedeiro reservatório e definitivo (Molina, Gradoni & Alvar, 2003).

A leishmaniose é transmitida de forma indirecta através do flebotómio vector. Outros artrópodes como as carraças *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus*, e as pulgas, poderão também ter importância como vectores transmissores (Center for Food Security and Public Health, 2009). Testes moleculares e serológicos para detecção de *Leishmania* por PCR e ELISA foram realizados em ectoparasitas colhidos de 73 cães infectados numa área endémica do Brasil. Do total de cães, 55% apresentavam-se parasitados por pulgas e 63% por carraças. Os resultados indicaram que 80% dos ectoparasitas continham *Leishmania infantum* (23% e 50% para pulgas e carraças respectivamente). A viabilidade do parasita nos artrópodes foi também analisada. Sete a 10 dias depois da colheita dos ectoparasitas, os amastigotas encontravam-se vivos e viáveis. Segundo os autores do estudo, apesar da prevalência ser alta, são necessários mais estudos para apurar o papel destes ectoparasitas na transmissão da leishmaniose (Colombo, Odorizzi, Laurenti, Galati, Canavez & Pereira-Chiocola, 2011).

A transmissão directa também é possível através de transmissão venérea, transfusão sanguínea e por via transplacentária em cães e humanos. Já foram isolados parasitas de *Leishmania infantum* na saliva, na urina, no sêmen e em secreções conjuntivais, assim como no sangue do cão (Center for Food Security and Public Health, 2009).

2.6.2. Importância da doença

2.6.2.1. Importância da doença no cão

O cão é considerado o elemento mais susceptível do ciclo de transmissão (Moreno & Alvar, 2002). Estão descritos factores predisponentes como a raça e a idade. Apesar de numa forma geral ocorrer alta susceptibilidade à doença, consideram-se as raças Boxer, Pastor Alemão, Cocker Spaniel e Rottweiler as mais predispostas à infecção por *Leishmania infantum*. A idade também é considerada como factor predisponente uma vez que a prevalência é mais alta em cães com idade inferior a 3 anos e superior a 8 anos (Solano-Gallego, Miró, Koutinas, Cardoso, Pennisi, Ferrer, Bourdeau, Oliva & Baneth, 2011).

Na baía mediterrânica estima-se 10% dos cães estejam infectados com *Leishmania infantum*. O sul da Europa, assim como a China e o continente americano, constitui um dos principais

focos mundiais de leishmaniose canina. Nestes locais, esta espécie de *Leishmania* é responsável pela leishmaniose visceral humana (Moreno & Alvar, 2002).

As prevalências médias para a leishmaniose canina no sul da Europa variam entre os 2% para a Itália continental e os 25% para a Grécia. O valor médio de prevalência para Espanha é de 8,5%, 15% para a península italiana, 15,7% para a Turquia, 20% para o Chipre e Portugal. No caso de França os valores variam entre os 4% e os 20% (Dujardin, Campino, Cañavate, Dedet, Gradoni, Soteriadou, Mazeris, Ozbel & Boelaert, 2008).

Em Portugal, em 2009, num projecto denominado “Semana da Leishmaniose”, 132 clínicas veterinárias procederam ao rastreio serológico gratuito a 4004 cães residentes em todo o país. A prevalência apurada foi de 6% para Portugal continental (Observatório Nacional das Leishmanioses, 2009). Os resultados preliminares para os diferentes distritos estão representados na tabela 3.

Tabela 3 – Prevalências para leishmaniose canina em 2009 em 18 distritos de Portugal (baseado em Observatório Nacional das Leishmanioses, 2009).

Distrito	Prevalência
Castelo Branco Portalegre Beja	10-16%
Vila Real Bragança Guarda Viseu Coimbra Santarém Lisboa	5-10%
Viana do Castelo Braga Porto Aveiro Leiria Évora Setúbal Faro	<5%

Considera-se que a presença de cães infectados de forma sintomática ou assintomática contribui de forma importante para a manutenção da endemia da leishmaniose humana, uma vez que são potencialmente infectantes para o vector (Campino & Maia, 2010).

2.6.2.2. Importância da doença no homem

Estima-se actualmente o aparecimento de um milhão e meio de casos de leishmaniose cutânea e quinhentos mil casos de leishmaniose visceral humana por ano. Cerca de 350 milhões de pessoas vivem em áreas activas de transmissão da doença. A World Health Organization estima 12 milhões de casos em todo o mundo com 60.000 mortes anuais. Afirma ainda que nas últimas décadas, o número de regiões endémicas e de casos declarados tem aumentado. Em adição, referencia que um número substancial fica por apurar, já que, em apenas 32 dos 88 países afectados, a notificação é obrigatória. Implica também a doença como factor de discriminação social e como obstáculo ao desenvolvimento e produtividade económica em áreas remotas dos países mais afectados (WHO, 1990).

Diversos autores afirmam que se trata de uma doença negligenciada aliada à pobreza e à escassez de recursos em que o risco de infecção e manifestação clínica é maior. Com efeito, para além das medidas de vigilância e controlo serem insuficientes, não existem medicamentos eficazes de baixo custo ou de fácil administração. O incentivo à investigação e ao desenvolvimento de novos fármacos pela indústria farmacêutica também é reduzido (Dujardin, Campino, Cañavate, Dedet, Gradoni, Soteriadou, Mazeris, Ozbel & Boelaert, 2008).

Co-infecções por *Leishmania* e VIH são frequentemente reportadas em distribuições geográficas onde as duas doenças coexistem: sul da Europa, África, Médio Oriente, América central e do sul, sudoeste asiático e subcontinente indiano. No entanto, estima-se que o número de situações reportadas seja apenas uma pequena fracção uma vez que a dificuldade no reconhecimento, diagnóstico e sinergismo das doenças é maior nos países subdesenvolvidos (Ezra, Ochoa & Craft, 2010). Certos autores afirmam que a espécie *Leishmania infantum* está a assumir importância como agente oportunista em infecções por VIH, mostrando assim as suas verdadeiras características endémicas (Dujardin *et al.*, 2008).

Numa fracção do panorama europeu no final de 2006, em Portugal, Espanha, Itália e França, um total cumulativo de casos de co-infecção ascendeu a 2152, dos quais 233 pertenciam a Portugal. Ainda em Portugal, estimativas indicam o aparecimento de 15 a 20 casos por ano de Leishmaniose visceral em indivíduos imunocompetentes. Entre o ano 2000 e o ano 2009 foram diagnosticados no Instituto de Higiene e Medicina Tropical 173 casos de leishmaniose visceral humana. Do total de casos, 107 pertenciam a adultos imunodeprimidos, enquanto os restantes 66 pertenciam a 20 adultos e 46 crianças imunocompetentes. No homem estima-se que por cada caso sintomático, existem dez assintomáticos (Campino & Maia, 2010).

2.6.3. Factores de risco

Segundo Ready (2010), existem três factores de risco para a emergência ou re-emergência da leishmaniose na Europa:

- 1 - A introdução de espécies ou estirpes exóticas provenientes dos mais variados países devido à incessante deslocação de viajantes, imigrantes e cães domésticos;
- 2 - A colonização de novos habitats em países vizinhos por vectores contaminados onde já existem outros vectores não-contaminados, promovendo o alastramento da infecção;
- 3 - A re-emergência da doença na região mediterrânica devido ao crescente número de pessoas em estádios de imuno-supressão.

No entanto, a probabilidade da entrada de espécies exóticas no ciclo de transmissão é baixa. Esta depende do contacto entre pessoas e flebotomíneos, da capacidade do indivíduo infectado agir como hospedeiro reservatório e da susceptibilidade do vector europeu albergar a espécie exótica. O mesmo princípio aplica-se também para a exportação de espécies europeias para o Novo Mundo (Dujardin *et al.*, 2008).

Segundo Campino & Maia (2010), outros factores de risco incluem as alterações ambientais, condições sócio-económicas e a resistência do parasita e do vector aos fármacos e insecticidas actualmente em utilização. Outro factor a ter em conta é a desflorestação e urbanização, que favorecem a consequente aproximação dos insectos vectores aos ambientes urbanos e peri-urbanos com a consequente colonização de novos habitats (Rangel & Lainson, 2009).

2.7. Diagnóstico

Solano-Gallego *et al.*, (2011) referem que o diagnóstico da leishmaniose canina é complexo. A grande variedade de manifestações clínicas, a possível presença de doença concomitante e co-infecções dificultam o diagnóstico diferencial. Desvios nos exames complementares de diagnóstico de primeira linha como o hemograma, perfil bioquímico e urianálise podem revelar fraca especificidade.

2.7.1. Diagnóstico parasitológico e molecular

O diagnóstico parasitológico em detrimento de uma baixa sensibilidade oferece uma alta especificidade e visa a detecção directa do parasita. A citologia, com a biópsia de pele em lesões cutâneas, dos linfonodos, da medula óssea ou do baço, após coloração com corante de Wright ou Giemsa, permitem a visualização directa de *Leishmania* ao microscópio óptico. O exame histopatológico também é utilizado quando se efectuam colheitas de fragmentos de órgãos (Center for Food Security and Public Health, 2009). Estes exames para além de terem baixa sensibilidade, têm a desvantagem de não revelar o estado imunológico do paciente.

A técnica de diagnóstico molecular *Polymerase Chain Reaction* (PCR), devido à sua alta sensibilidade, pode ser utilizada conjuntamente com o exame citológico e histopatológico em casos de não visualização do parasita. Esta técnica, também com alta especificidade, se for utilizada na variante *Real-time*, permite quantificar a carga parasitária. Esta quantificação além de fornecer informação adicional ao diagnóstico qualitativo, permite também monitorizar a resposta ao tratamento (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

A cultura em meio de Novy-McNeil-Nicole (NNN), *Brain-Heart infusion* (BHI) entre outros, pode ser utilizado para diagnóstico *in vitro*, assim como a inoculação em murganhos para diagnóstico *in vivo*. O diagnóstico *in vitro* requer 5 a 30 dias, enquanto *in vivo* pode ser efectuado semanas a meses pós-inoculação (Center for Food Security and Public Health, 2009). Este método de diagnóstico permite o isolamento do parasita e facilita a tipagem isoenzimática. Apresenta a desvantagem de requerer um longo período de tempo para o diagnóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

2.7.2. Diagnóstico serológico

Ao contrário do método parasitológico que tem como objectivo a detecção directa de *Leishmania*, o método serológico visa a detecção de anticorpos anti-*Leishmania*. A sua sensibilidade é mais elevada do que no método parasitológico e permite apurar a titulação de anticorpos, assim como estabelecer um prognóstico. No entanto, requer um período de sero-conversão, o que significa que a sua sensibilidade é baixa em fases precoces de doença (Center for Food Security and Public Health, 2009).

Os métodos de diagnóstico serológico classificam-se em qualitativos e quantitativos. O método qualitativo por imunocromatografia é utilizado nas clínicas veterinárias sob a forma de *kit* rápido e permite obter um resultado célere. No entanto a sua sensibilidade é variável, existe risco de obtenção de resultados falsos negativos e os resultados positivos requerem avaliação posterior com métodos quantitativos. Os métodos quantitativos como o *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) ou o *Indirect Fluorescence Antibody Test* (IFAT) são conclusivos no diagnóstico. Têm como desvantagem a diferente padronização das técnicas e dos resultados nos diferentes laboratórios (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

2.8. Medidas de prevenção e controlo

2.8.1. Medidas de prevenção e controlo no cão

No cão, as medidas de prevenção incluem a vacinação e a utilização de produtos veterinários baseados em repelentes de insectos com eficácia demonstrada, como os piretróides sintéticos permetrina ou deltametrina. Estes são aplicáveis sob a forma de coleiras com eficácia durante

5 a 6 meses ou fórmulas *spot on*, eficazes durante três semanas. Outras medidas como manter os animais dentro das habitações desde o anoitecer até de madrugada durante a estação de maior actividade dos insectos vectores, a eliminação dos micro-habitats na periferia dos domicílios e a utilização de insecticidas no interior poderão ser utilizadas para maximizar a protecção dos animais contra a doença (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

2.8.1.1. Vacinação

Portugal foi o primeiro país europeu a receber a vacina CaniLeish® na primeira metade de 2011 seguido da França, Espanha, Itália e Grécia (F. Ferraz, comunicação pessoal, Novembro 28, 2011). Trata-se de uma vacina de segunda geração, baseada em proteínas de excreção de *Leishmania infantum* (European Medicines Agency, 2011). Estas proteínas apresentam alta imunogenicidade e aliadas ao adjuvante QA-21, uma saponina purificada, resultam numa alta imunidade celular estimulando a produção de linfócitos T citotóxicos e a resposta celular Th-1. A duração da imunidade obtida com esta vacina é de um ano e a taxa de imunidade apurada foi de 92,7% (Virbac, 2011).

2.8.2. Medidas de prevenção e controlo no Homem

Segundo o Center for Food Security and Public Health (2009), as medidas de prevenção da leishmaniose nos seres humanos em áreas endémicas devem incluir o uso de repelentes para insectos, cobrir a maior área possível de pele exposta e fazer o possível para permanecer nos pisos mais altos das habitações durante o crepúsculo e a noite, utilizar ventoinhas, insecticidas e redes mosquiteiras tratadas com insecticida nas camas. A aplicação de insecticidas nas superfícies dos interiores das casas é eficiente durante alguns meses e deve ser utilizada em conformidade com os períodos de ano em que existe maior perigo de transmissão. Estes insecticidas são compostos por organoclorados (DDT e dieldrina), organofosforados (malatião), carbamatos (propoxur) e piretróides sintéticos (permetrina e deltametrina). O composto que representa melhor relação custo-eficácia é o DDT. Para além de ser eficaz, tem efeito residual longo e é relativamente seguro. No entanto, já foram descritas resistências dos flebotómios a este composto (Sharma & Singh, 2008). Os mesmos autores sugerem a utilização de medidas de controlo ambiental como a destruição de tocas de roedores ou o tratamento de fendas e buracos das paredes com lama e limão (que devido ao seu poder absorvente de humidade, limita as condições ideais de reprodução dos flebotómios). Sugerem ainda medidas de combate biológico. Algumas plantas como *Solanum jasminoides* (jasmim), *Ricinus communis* (rícin), ou *Bougainvillea glabra* (buganvília) têm efeito tóxico em flebotómios adultos. A utilização de feromonas pode também ser benéfica. Com efeito, foi

testada com sucesso a síntese artificial de feromonas “9-methylgermacrene-B” a partir de compostos de plantas (Bray, Bandi, Brazil, Oliveira & Hamilton, 2009).

3. Infecção por *Leishmania* em roedores silvestres

3.1. Introdução

Em 1937 na Amazónia, surgiu a suspeita da existência de um reservatório silvestre da leishmaniose cutânea. Roedores do género *Oryzomys* apresentavam lesões suspeitas na cauda enquanto vários surtos de leishmaniose cutânea ocorreram em indivíduos que trabalhavam na floresta. As lesões foram ignoradas até 1968, ano em que finalmente foram isolados parasitas das lesões das caudas. Isolamento, cultura, infecção experimental e testes de intradermoreacção foram realizados com sucesso (Guimarães, Azevedo e Damasceno, 1968). Ainda no Brasil em 1960, foi descoberta a infecção por *Leishmania* num roedor da espécie *Rattus rattus* que apresentou cultura de sangue positiva (Alencar, Pessoa & Fontenele, 1960). No sul de Espanha foi realizado um estudo com o objectivo de apurar perfis isoenzimáticos de *Leishmania infantum*. Um espécime de *Rattus rattus* apresentou o zimodeme MON-1. Este zimodeme foi também encontrado em 70 cães com leishmaniose visceral e em 3 cães com leishmaniose cutânea, em 8 espécimes de *Phlebotomus perniciosus*, em 2 pacientes humanos com leishmaniose cutânea e muco-cutânea e em 9 pacientes com co-infecção por VIH e leishmaniose visceral (Martin-Sanchez, Gramiccia, Di Muccio, Ludovisi & Morillas-Márquez, 2004).

3.2. Estudos de infecção natural por *Leishmania* em roedores silvestres

3.2.1. Brasil

3.2.1.1. Estado de Minas Gerais

3.2.1.1.1. Ponte do Gravatá (Oliveira, Pirmez, Pires, Brazil & Pacheco, 2005).

Em Ponte do Gravatá, uma pequena comunidade rural endémica para leishmaniose visceral e cutânea humanas no estado de Minas Gerais, entre Maio e Setembro de 2001 foi efectuado um estudo em 62 roedores. Do total, 21 pertenciam à espécie *Rattus rattus*, 18 à espécie *Thricomys apereoides*, 13 à espécie *Oryzomys subflavus*, 4 à espécie *Bolomys lasiurus*, 5 à espécie *Galea spixxi* e 1 à espécie *Wiedomys pyrrhorhinos*. A maioria foi capturada nos arredores das plantações de cana-de-açúcar, à excepção dos espécimes de *Rattus rattus* que foram capturados no interior de edifícios.

Foram recolhidas duas amostras de cada roedor. Uma de pele, sendo recolhida uma porção triangular proveniente do pavilhão auricular e uma de sangue, proveniente de uma incisão na cauda. Ambas foram submetidas a PCR.

Três espécies apresentaram infecção: *Rattus rattus*, *Thricomys apereoides* e *Oryzomys subflavus*. Do total de 21 espécimes de *Rattus rattus*, 4 (19%) amostras de sangue foram positivas para *Leishmania mexicana*, 1 (4,7%) positiva para *Leishmania chagasi* e 1 (4,7%) positiva para *Leishmania braziliensis*. Dos 18 exemplares de *Thricomys apereoides*, 5 (27,7%) amostras de sangue foram positivas para *Leishmania mexicana* e 2 (11,1%) amostras de pele para *Leishmania chagasi*. Dos 13 exemplares de *Oryzomys subflavus*, um (7,6%) apresentou uma amostra de pele positiva para *Leishmania braziliensis*.

3.2.1.1.2. Cidade de Belo Horizonte (Neiva, 2005).

Na cidade de Belo Horizonte, entre Abril de 2003 e Dezembro de 2004 foi realizado um estudo de sero-prevalência de *Leishmania* sp. em 98 animais da espécie *Rattus norvegicus*.

O diagnóstico foi efectuado por ELISA, em placas de fundo plano com antigénio de *Leishmania amazonensis* e IgG de rato marcada com peroxidase obtida de soro imune de cabra na diluição 1:17000. Foi também utilizado o teste de IFAT, com a utilização de lâminas contendo o mesmo antigénio e conjugado anti IgG de rato marcado com isotiocianato de fluoresceína, obtido também de soro imune de cabra, na diluição 1:128.

Do total de animais testados, 63 animais foram positivos: vinte e sete (27,6%) a IFAT e ELISA, dez (10,2%) apenas positivos a IFAT e vinte e seis (26,5%) apenas a ELISA.

3.2.1.1.3. Cidade de Belo Horizonte (Melo, 2008).

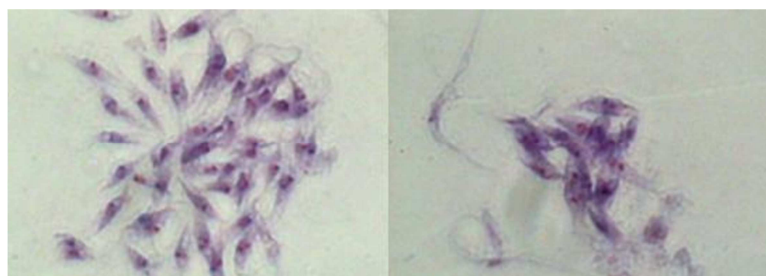
No nordeste da cidade de Belo Horizonte, região endémica para leishmaniose cutânea e visceral humanas, foram testados 96 animais entre Junho de 2006 e Junho de 2007. As espécies de roedores capturados foram: *Akodon* sp. (n=1), *Bolomys lasiurus* (n=4), *Didelphis albiventris* (n=33), *Didelphis aturita* (n=1), *Galictis* sp. (n=2), *Mus musculus* (n=22), *Oryzomys subflavus* (n=5), *Rattus norvegicus* (n=9) e *Rattus rattus* (n=19). Os ambientes escolhidos foram o peri-domiciliário e o extra-domiciliário.

Fragmentos de pele de cauda, baço e medula óssea foram submetidos a cultura em meio de NNN enriquecido com LIT (*Liver infusion Tryptose*) durante 4 semanas. Fracções de cultura foram avaliadas semanalmente quanto à presença de promastigotas.

Sangue, medula óssea, fragmentos de pele de pavilhão auricular, cauda, fígado e baço foram colhidos e submetidos a PCR.

Do total de culturas, apenas duas (2%) foram positivas para formas flageladas (Figura 13). Ambas as culturas provieram de medula óssea de dois animais da mesma espécie: *Didelphis albiventris*.

Figura 13 – Culturas de *Leishmania* positivas provenientes de dois animais da espécie *Didelphis albiventris* (fonte: Melo, 2008).



No diagnóstico molecular foi apurada uma percentagem de positividade de 29,2% (n=28). Os órgãos mais atingidos foram a cauda (14/96), o fígado (13/96) e a pele de pavilhão auricular (11/96). Os fragmentos de baço e medula apresentaram menor taxa de positividade (7/96 e 2/96 respectivamente) e o sangue não revelou infecção.

No teste de PCR, um total de 46% apresentou positividade em dois ou mais tecidos. À exceção de *Akodon* sp., todas as espécies de roedores testados apresentaram resultado positivo em pelo menos um tecido testado. A espécie *Bolomys lasiurus* apresentou um animal positivo (25%) oriundo do meio extra-domiciliário; *Didelphis albiventris* apresentou 7 animais positivos (21%) também em meio extra-domiciliário; *Didelphis aturita* apresentou 1 animal positivo (100%) em meio extra-domiciliário; *Galictis* sp. apresentou 2 animais positivos (100%) em meio extra-domiciliário; *Mus musculus* apresentou 6 animais positivos (27%) em meio peri-domiciliário e 2 animais (9%) em meio extra-domiciliário; *Oryzomys subflavus* apresentou 2 animais positivos (40%) em meio extra-domiciliário; *Rattus norvegicus* apresentou um animal positivo (5%) em cada meio e *Rattus rattus* apresentou 5 animais positivos (26%), todos em meio peri-domiciliário.

3.2.1.2. Estado de Pernambuco (Júnior, 2010).

3.2.1.2.1. Município de Imbú

Outro estudo de infecção por *Leishmania* sp. foi efectuado numa área suburbana endêmica para leishmaniose cutânea humana, no município de Imbú, Vicência, na Zona da Mata Norte em Pernambuco. Entre Fevereiro de 2008 e Setembro de 2009, foram capturados, submetidos a eutanásia e testados 174 roedores pertencentes a 6 diferentes espécies: *Nectomys squamipes*

(n=98), *Rattus rattus* (n=49), *Necromys lasiurus* (n=12), *Holochilus sciureus* (n=9), *Oryzomys subflavus* (n=3) e *Galea spixii* (n=3). O autor refere que apenas a espécie *Rattus rattus* foi capturada em ambiente intra-domiciliário (n=3) e peri-domiciliário (n=7). Todos os restantes roedores foram capturados em ambiente extra-domiciliário.

Para todos os animais foram realizados inóculos em meio de NNN com fragmentos de baço. Para PCR foram colhidos fragmentos de fígado (n=173), baço (n=174) e pele proveniente de um pavilhão auricular (n=170). As culturas foram observadas por 21 dias, em intervalos de 3 a 5 dias.

Nenhum isolamento foi obtido em cultura ao fim de 21 dias. Os resultados para PCR de pele revelaram uma positividade total de 26,5% (n=45); 27,8% para *Nectomys squamipes* (n=27), 26,1% para *Rattus rattus* (n=12), 16,7% para *Necromys lasiurus* (n=2), 33,3% para *Holochilus sciureus* (n=3) e 33,3% para *Galea spixii* (n=1). Nenhum dos exemplares de *Oryzomys subflavus* apresentou resultado positivo.

Os resultados de PCR de baço indicaram uma percentagem total de casos positivos de 12,1% (n=21); 11,2% para *Nectomys squamipes* (n=11), 16,3% para *Rattus rattus* (n=8) e 22,2% para *Holochilus sciureus* (n=2). Nenhum dos espécimes de *Necromys lasiurus*, de *Oryzomys subflavus* ou *Galea spixii* apresentou positividade. Os resultados de PCR de amostras de fígado apresentaram uma positividade total de 2,9%. Apenas as espécies *Nectomys squamipes* e *Rattus rattus* figuram, com 4,1% (n=4) e 2% (n=1) respectivamente. Nenhum dos roedores apresentou resultado positivo simultâneo para as 3 amostras testadas.

3.3. Venezuela

3.3.1. Estado de Anzoátegui (Zulueta, Villarroel, Rodriguez, Feliciangeli, Mazarri, Reyes, Rodriguez, Centeno, Barrios & Ulrich, 1999).

No estado de Anzoátegui, endêmico para leishmaniose visceral, foi efectuado um estudo. Este incidiu em humanos, flebotomos e hospedeiros silvestres. Os objectivos foram apurar as características clínicas, imunológicas e parasitológicas dos pacientes e identificar os vectores e hospedeiros silvestres envolvidos.

Um total de 20 roedores foi capturado e submetido a eutanásia. Entre eles estavam 2 espécimes de *Rattus rattus*, 8 *Sigmodon hispidus*, 5 *Proechymis* spp. e 5 *Calumorys phyllander*. Foram recolhidas amostras de pele, sangue, fígado e baço, sendo posteriormente submetidas a PCR e análise histopatológica.

No teste de PCR, apenas um roedor da espécie *Rattus rattus* foi positivo. A espécie apurada foi *Leishmania donovani*. As amostras positivas foram sangue, fígado e baço. Outro roedor da

espécie *Sigmodon hispidus* foi positivo no exame histopatológico de pele, em uma amostra colhida de uma lesão verrucosa. A espécie de *Leishmania* não foi apurada.

3.3.2. Estado de Lara (De Lima, De Guglielmo, Rodríguez, Convit & Rodriguez, 2002).

No sudoeste venezuelano, no estado de Lara, foi realizado um estudo numa vila chamada La Matica, de actividade agrícola e endémica para leishmaniose cutânea humana.

Foram capturados 68 espécimes de *Rattus rattus*, 10 *Akodon* sp., 2 *Rhipidomys* sp., 3 *Oryzomys* sp., 3 *Sciurus* sp., 1 *Zygodontomys* sp., 1 *Mus musculus* e 3 *Proechimys* sp.. Aos animais foram realizadas colheitas de sangue por punção cardíaca sob anestesia. Os animais foram posteriormente submetidos a eutanásia e amostras de pele, fígado e baço foram analisadas por microscopia óptica e submetidas a cultura em agar-sangue de coelho contendo 200 unidades de penicilina. A espécie de *Leishmania* infectante foi apurada por PCR de material de cultura positivo.

Do total de animais testados, apenas os exemplares da espécie *Rattus rattus* demonstraram infecção. De todos os animais pertencentes a esta espécie, 15 (50%) dos 30 espécimes testados por esfregaço de sangue, 28 (41,1%) dos 68 espécimes testados por exame parasitológico e 17 (29,3%) dos 58 espécimes testados por cultura foram positivos. As espécies apuradas por PCR foram *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana* em 3 e em 2 animais, respectivamente. Nos restantes animais não foi possível apurar a espécie de *Leishmania* devido a crescimento insuficiente em cultura.

3.4. México

3.4.1. Estado de Campeche (Canto-Lara, Wynsberghe, Vargas-González, Ojeda-Farfán & Andrade-Narváez, 1999).

Na floresta do estado de Campeche, endémica para leishmaniose cutânea humana, foi efectuado um estudo com o intuito de detectar e apurar as espécies de *Leishmania* presentes nos roedores silvestres. As capturas foram realizadas entre Fevereiro de 1993 e Março de 1994 a 8 km da vila La Libertad, nos arredores de Escarcega.

Os animais foram mantidos em cativeiro pelo período de dois anos para posteriores estudos na Universidade de Yucatán. Os isolados foram obtidos através de aspiração com agulha fina na pele da base da cauda dos animais. Os aspirados foram posteriormente submetidos a cultura a 22°C em meio de Senekjje modificado. As espécies envolvidas foram determinadas por IFAT com anticorpos monoclonais específicos fornecidos, pertencendo a espécies dos dois sub-géneros *Leishmania* e *Viannia*. As diluições utilizadas foram 1:50 para os anticorpos monoclonais e 1:25 para o conjugado de isotiocianato de fluoresceína e IgG.

O total dos 21 roedores testados apresentou infecção. A maioria apresentava lesões na cauda embora parte fosse assintomática. Os espécimes identificados foram 6 *Otodylomys phyllotis*, 8 *Oryzomys melanotis*, 5 *Peromyscus yucatanicus* e 2 *Sigmodon hispidus*. A espécie de *Leishmania* presente foi para todos os exemplares, *Leishmania mexicana*.

Parte dos autores continuou o estudo na Universidade de Yucatán visando avaliar a evolução da doença. Aos 21 roedores foram adicionados 8, capturados no mesmo local e também com infecção por *Leishmania mexicana*: três espécimes de *Otodylomys phyllotis*, 4 de *Oryzomys melanotis*, e 1 de *Peromyscus yucatanicus*.

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração para leporídeos, sementes de girassol, milho e fruta. Mensalmente foram anotadas alterações na aparência das lesões pré-existent, novos aspirados foram colhidos e submetidos a nova cultura no meio previamente utilizado. Esfregaços de material proveniente das culturas foram corados com Giemsa e observados ao microscópio óptico. Os animais foram considerados positivos sempre que fosse detectado pelo menos um promastigota ao microscópio e negativos se nenhum promastigota fosse detectado durante um mês. Os animais que apresentaram excessiva debilidade foram submetidos a eutanásia e foram realizadas a partir dos seus órgãos, exames parasitológicos de fígado, baço e linfonodos poplíteos.

Quanto à persistência da infecção, não ocorreu diferença estatística na sobrevivência dos animais entre os diferentes graus de infecção. Na espécie *Sigmodon hispidus*, um exemplar demonstrou infecção persistente durante 15 meses tendo sido de seguida submetido a eutanásia, enquanto no outro a evidência de infecção foi intermitente durante 21 meses. Nenhuma correlação estatística pôde ser aplicada por apenas estarem disponíveis dois espécimes para estudo. Na espécie *Oryzomys melanotis*, os autores observaram positividade persistente e uma mortalidade elevada independentemente da gravidade da infecção. Na espécie *Otodylomys phyllotis* os resultados foram irregulares: três indivíduos apresentaram infecção persistente durante 18 meses, três foram positivos apenas no momento da captura e os restantes apresentaram intermitência. Os resultados para a espécie *Peromyscus yucatanicus* foram também intermitentes.

No que se refere à evolução das lesões, nos espécimes de *Sigmodon hispidus* os resultados foram diferentes em cada animal. Num dos exemplares estava presente uma úlcera na cauda. A úlcera cicatrizou dois meses mais tarde e o local manteve-se edemaciado. Posteriormente ocorreu despigmentação da pele. Metástases foram-se tornando lentamente evidentes, inicialmente em redor do ânus e posteriormente na face posterior das coxas e pavilhão auricular 10 meses depois. O outro exemplar manteve-se saudável e apresentou apenas uma pequena mancha branca no terço proximal da cauda. Os espécimes de *Oryzomys melanotis*

evidenciaram sinais de leishmaniose com alopecia, eritema e edema no terço proximal da cauda. Um apresentou uma úlcera que cicatrizou no mês seguinte, dois apresentaram alopecia na face posterior das coxas e morreram pouco tempo depois e os dois restantes apresentaram áreas despigmentadas em toda a cauda. Nas espécies *Peromyscus yucatanicus* e *Otodylomys phyllotis* as lesões mantiveram-se pouco aparentes.

O estudo da disseminação sistêmica mostrou que num espécime de *Sigmodon hispidus* foram detectados amastigotas no fígado, baço e linfonodos. Estes últimos estavam negros e hipertrofiados no momento da colheita. No outro foram encontradas formas amastigotas no fígado. Na espécie *Oryzomys melanotis*, em três roedores foram detectadas formas amastigotas no fígado e baço. Um destes foi submetido a eutanásia devido a dispneia e apresentou hepatomegalia com granuloma, esplenomegalia, efusão pleural e edema subcutâneo. Em apenas um dos seis *Otodylomys phyllotis* foram detectadas formas amastigotas, apresentando-se no fígado. Este apresentava ascite e edema subcutâneo. Quatro *Peromyscus yucatanicus* apresentaram formas amastigotas em todos os órgãos submetidos a exame parasitológico (Wynsberghe, Canto-Lara, Damián-Centeno, Itzá-Ortiz & Andrade-Narváez, 2000).

3.5. Chipre (Psaroulaki, Antoniou, Toumazos, Mazeris, Ioannou, Chochlakis, Christophi, Loukaides, Patsias, Moschandrea & Tselentis, 2010).

Na ilha do Chipre com a sua geomorfologia peculiar, fauna e flora de grande riqueza e diversidade, com grandes amplitudes térmicas e de pluviosidade, foi realizado um estudo epidemiológico abrangente. Entre 2000 e 2003 foram capturados 622 roedores provenientes de 51 áreas residenciais e de prática agrícola.

Foi pesquisada por IFAT não só a presença de anticorpos anti-*Leishmania infantum*, mas também anti-*Rickettsia typhi*, anti-*Rickettsia conorii*, anti-*Toxoplasma* sp., anti-*Coxiella burnetti* e anti-*Bartonella henselae*. Neste texto apenas serão expostos os resultados para a pesquisa de *Leishmania*. Os restantes resultados serão apresentados no anexo 1.

Do total de roedores capturados, 402 pertenciam à espécie *Rattus norvegicus* e 220 à espécie *Rattus rattus*. Para a pesquisa da presença de *Leishmania* foram testados 496 espécimes, 344 *Rattus norvegicus* e 152 *Rattus rattus*. Amostras de sangue foram obtidas a partir de punção cardíaca. Foi utilizado conjugado IgG anti-rato purificado obtido de coelho, marcado com isotiocianato de fluoresceína. A diluição utilizada foi de 1:30. Foram consideradas positivas diluições de 1:60 e superiores.

Dos 344 *Rattus norvegicus* e 152 *Rattus rattus*, 19 (5,6%) e 17 (11,2%) respectivamente, apresentaram resultado positivo. A sero-prevalência total apurada foi de 7,3%. Os autores

referem que estatisticamente houve um local onde a sero-prevalência foi maior. Os resultados estão apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Sero-prevalência de *Leishmania infantum* em roedores no Chipre em função da localidade e época do ano (baseado em Psaroulaki *et al.*, 2010).

<u>Característica</u>		<u>Nº de Roedores testados</u>	<u>Sero-prevalência (%)</u>
Espécie	<i>R. norvegicus</i>	344	19 (5,6%)
	<i>R. rattus</i>	152	17 (11,2%)
Localidade	Nicósia	153	2 (1,3%)
	Famagusta	22	3 (13,6%)
	Larnaca	175	16 (9,1%)
	Limassol	105	15 (14,3%)
	Paphos	41	0
Época do ano	Primavera	98	2 (2,1%)
	Verão	184	25 (13,6%)
	Outono	180	9 (5%)
	Inverno	34	0

3.6. Itália

3.6.1. Calábria e Sicília (Di Bella, Vitale, Russo, Greco, Milazzo, Aloise, Cagnin, 2003).

Em 2003, no sul de Itália, nas regiões de Calábria e Sicília, foram apurados resultados de presença de *Leishmania* em roedores. As capturas foram efectuadas em 1997 e foi estudado um total de 54 roedores das espécies *Rattus rattus* (n=28), *Rattus norvegicus* (n=9) e *Mus musculus* (n=17). Da espécie *Rattus rattus*, 24 foram oriundos de Calábria e 4 da Sicília; da espécie *Rattus norvegicus*, os 9 foram oriundos da Sicília e da espécie *Mus musculus*, 4 foram oriundos de Calábria enquanto os restantes 13 foram originários da Sicília.

O diagnóstico foi efectuado por IFAT com um limiar de positividade de 1/40 com a utilização de conjugados IgG anti-rato e IgG anti-ratinho marcados com isotiocianato de fluoresceína e por PCR após extracção de ADN proveniente de amostras de baço. A espécie de *Leishmania* presente nos animais capturados na região de Calábria foi apurada através de PCR.

Do total de animais testado por IFAT, 59% dos espécimes de *Rattus rattus* (n=13), 33,3% dos *Rattus norvegicus* (n=3) e 5,8% dos *Mus musculus* (n=1) apresentaram resultado positivo. O

estudo realizado por PCR permitiu concluir que a espécie de *Leishmania* presente nos roedores da espécie *Rattus rattus* provenientes da região de Calábria era *Leishmania infantum*. Apesar de ter ocorrido alguma discrepância nos resultados serológicos e moleculares, a prevalência apurada por PCR foi de 45% (n=20).

3.7. Grécia

3.7.1. Atenas e Pireus (Papadogiannakis, Spanakos, Kontos, Menounos, Tegos & Vakalis, 2009).

Na Grécia central, foram testados para *Leishmania infantum*, por PCR, 16 *Rattus norvegicus* provenientes dos subúrbios de Atenas e Pireus. Os animais foram submetidos a eutanásia e fragmentos de baço foram colhidos e testados. Apenas um animal (6,3%) foi positivo.

3.8. Irão

3.8.1. Totalidade da República iraniana (Mohebbi, Javadian, Yaghoobi-Ershadi, Akhavan, Hajjaran & Abaei, 2004).

O estudo da infecção por *Leishmania* em roedores no Irão iniciou-se em 1953 no nordeste do país. No entanto, nunca tinha sido efectuado o isolamento e caracterização parasitária.

Em áreas endémicas em toda a república foi efectuado um estudo de grande proporção entre os anos 1991 e 2000. Os locais escolhidos para a captura dos roedores basearam-se em relatórios de surtos de leishmaniose cutânea e visceral humana, efectuados pelas autoridades de saúde. Foi testado um total de 1070 roedores de variadas espécies: 566 roedores provenientes de áreas endémicas para leishmaniose cutânea e 504 roedores capturados em zonas endémicas para leishmaniose visceral.

Em cada roedor, o isolamento do parasita foi efectuado por exame parasitológico da pele do pavilhão auricular, fígado e baço. As lâminas foram posteriormente fixadas com metanol, coradas com Giemsa e observadas com microscópio óptico na ampliação de 100x. As amostras provenientes de animais infectados foram submetidas a cultura em meio de NNN, LIT e RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino inactivado pelo calor. As culturas foram analisadas para a presença de promastigotas duas vezes por semana durante seis semanas. As espécies de *Leishmania* encontradas foram caracterizadas por *random amplified polymorphic DNA-Polymerase chain reaction* (RAPD-PCR) e por tipagem isoenzimática.

Do total de animais provenientes de áreas endémicas para leishmaniose cutânea, 105 (18,6%) foram positivos no exame parasitológico de pele. *Leishmania major* foi isolada nas espécies *Rhombomys opimus*, *Meriones libycus*, *Tatera indica* e *Meriones hurrianae*. *Leishmania*

turanica foi isolada a partir de um espécime de *Rhombomys opimus*. Os resultados estão representados na tabela 5.

Tabela 5 – Espécies de *Leishmania* isoladas em roedores provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose cutânea no Irão (baseado em Mohebbali, *et al.*, 2004).

Local de captura	Espécie de roedor	Nº testado	Positivos Nº	%	Espécie de <i>Leishmania</i>
Nordeste (Distrito de Minoo Dasht)	<i>Rhombomys opimus</i>	27	23	85,2	<i>L. major</i>
	<i>Meriones libycus</i>	1	0	0	-
Sul (Distritos de Dashti e Dashtestan)	<i>Tatera indica</i>	133	6	4,5	<i>L. major</i>
	<i>Meriones crassus</i>	48	0	0	-
	<i>Rattus Rattus</i>	3	0	0	-
	<i>Nesokia indica</i>	3	0	0	-
	<i>Mus musculus</i>	5	0	0	-
Sudeste (Distrito de Baluchestan)	<i>Meriones hurrianae</i>	28	5	17,9	<i>L. major</i>
	<i>Tatera indica</i>	27	1	3,7	<i>L. major</i>
	<i>Rattus Rattus</i>	3	0	0	-
	<i>Rattus norvegicus</i>	4	0	0	-
	<i>Mus musculus</i>	5	0	0	-
	<i>Nesokia indica</i>	2	0	0	-
	<i>Funambulus pennanti</i>	1	0	0	-
Este (Distrito de Mehran)	<i>Tatera indica</i>	22	2	9,1	<i>L. major</i>
	<i>Nesokia indica</i>	8	0	0	-
Centro (Distrito de Badrood)	<i>Meriones libycus</i>	36	9	25	<i>L. major</i>
	<i>Rhombomys opimus</i>	25	8	32	<i>L. major</i>
Sudoeste (Provincia de Fars)	<i>Meriones libycus</i>	97	34	35,1	<i>L. major</i>
	<i>Tatera indica</i>	21	3	14,3	<i>L. major</i>
Centro (Distrito de Arkadan)	<i>Rhombomys opimus</i>	26	3	11,5	<i>L. major</i>
	<i>Meriones libycus</i>	19	3	15,8	<i>L. major</i>
Centro (Distrito de Sabzevar)	<i>Rhombomys opimus</i>	22	8	36,4	<i>L. major/L. turanica</i>
TOTAL		566	105	18,6	

Dos animais capturados em áreas endêmicas para leishmaniose visceral, 69 (13,7%) foram positivos na análise parasitológica de fígado e de baço. As espécies *Leishmania infantum* e *Leishmania donovani* foram encontradas: *Leishmania infantum* zimodeme LON49 num espécime da espécie *Mesocricetus auratus*, e *Leishmania donovani* zimodeme LON50 num espécime de *Meriones persicus*. Em dois espécimes de *Cricetulus migratorius* foram também observados amastigotas mas não foi possível a identificação por não ter ocorrido desenvolvimento em cultura. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6 - Espécies de *Leishmania* isoladas em roedores provenientes de áreas endêmicas de leishmaniose visceral no Irão (baseado em Mohebbi *et al.*, 2004).

Local de captura	Espécie de roedor	Nº Testado	Positivos a exame parasitológico		Positivos a cultura		Espécies e zimodemes de <i>Leishmania</i>
			Nº	%	Nº	%	
Meshkin-Shahr	<i>Cricetulus migratorius</i>	15	2	13,3	0	0	-
	<i>Mesocricetus auratus</i>	2	1	50	1	50	<i>L. infantum</i> LON49
	<i>Meriones persicus</i>	394	66	16,8	2	0,5	<i>L. donovani</i> LON50
	<i>Mus musculus</i>	7	0	0	0	0	-
	<i>Allactaga sp.</i>	1	0	0	0	0	-
Distritos de Dashti e Dashtestan	<i>Tatera indica</i>	85	0	0	0	0	-
TOTAL		504	69	13,7	2	0,6	

3.8.2. Norte iraniano (Pourhohammadi, Motazedian & Kalantari, 2008).

No norte iraniano foi também estudada a incidência de *Leishmania* nos roedores silvestres. Entre 2001 e 2004, 339 roedores foram capturados em 12 aldeias: 298 da espécie *Nesokia indica*, 29 *Meriones libycus*, 10 *Mus musculus* e 2 *Microtus socialis*.

De cada roedor foram colhidas amostras de fígado e baço para análise parasitológica e observação com microscópio óptico. O material proveniente das análises positivas foi posteriormente submetido a PCR.

Uma percentagem de 58,4% (n=198) dos roedores continha formas amastigotas nos exames realizados. Foram positivos 183 exemplares da espécie *Nesokia indica* (61,4%) e 15 exemplares da espécie *Meriones libycus* (51,7%). Os resultados do teste PCR revelaram que a espécie de *Leishmania* envolvida foi em todos os casos, *Leishmania major*.

3.8.3. Sul iraniano

3.8.3.1. Província de Fars 2010 (Motazedian, Parhizkari, Mehrabani, Hatam & Asgari, 2010).

Foi realizado no sul do Irão em 2010 um estudo com o intuito de apurar a taxa de infecção por *Leishmania major* em roedores da espécie *Rattus norvegicus*, uma das espécies que co-habita com o homem em zonas onde predomina a agricultura. Entre Abril de 2004 e Abril de 2005 foram capturados 57 espécimes, que foram posteriormente submetidos a diagnóstico parasitológico e molecular.

Amostras de fígado, baço e pele foram submetidas a cultura em agar-sangue de coelho a 25°C e analisadas periodicamente. Foram consideradas negativas as que não evidenciaram desenvolvimento de promastigotas num prazo de dois meses e os parasitas provenientes de culturas positivas foram crio-preservados em nitrogénio líquido para serem posteriormente identificados por PCR e tipagem isoenzimática. Exames parasitológicos foram efectuados a partir de amostras de pele de pavilhão auricular, cauda, superfícies palmares das patas e lesões cutâneas, sendo posteriormente observadas ao microscópio óptico. Estas amostras foram também submetidas a PCR.

Dos 57 animais, apenas uma fêmea foi positiva no exame parasitológico e cultura. No teste molecular um total de 29 (50,8%) animais foi positivo: 23 (40,3%) foram positivos a PCR das amostras das superfícies palmares das patas, 18 (31,6%) a PCR de amostras de pavilhão auricular, 10 (17,5%) a PCR de fígado e 5 (8,8%) a PCR de baço. A espécie de *Leishmania* encontrada foi para todos os espécimes, *Leishmania major*.

3.8.3.2. Província de Fars 2011 (Parhizkari, Motazedian, Mehrabani, Asgari & Mehrabani 2011).

Ainda na Província de Fars, foi realizado em 2011 outro estudo com o intuito de apurar o papel dos roedores no ciclo da leishmaniose cutânea zoonótica humana causada pela espécie *Leishmania major*. Foram colocadas armadilhas em ambiente silvestre e urbano, em plantações, no interior e no exterior de habitações.

Foram capturados e estudados 89 roedores: 1 *Meriones libycus*, 3 *Meriones persicus*, 21 *Mus musculus* e 64 *Tatera indica*.

Amostras de ambos os pavilhões auriculares, ambas as almofadas plantares traseiras, fígado e baço foram submetidas a diagnóstico por PCR. Nenhuma lesão foi encontrada.

Um total de 3 (100%) dos roedores da espécie *Meriones persicus*, 35 (54,7%) dos roedores da espécie *Tatera indica* e 9 (42,9%) roedores da espécie *Mus musculus* apresentaram resultado positivo para infecção por *Leishmania major*.

Os tecidos positivos a PCR e suas respectivas percentagens para cada espécie estão representadas na tabela 7.

Tabela 7 – Tecidos positivos para *Leishmania major* nas espécies *Meriones persicus*, *Tatera indica*, *Mus musculus* e *Meriones libycus* (baseado em Parhizkari *et al.*, 2011).

	<i>M. persicus</i>	<i>T. indica</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. libycus</i>
Nº de roedores	3	64	21	1
Tecidos positivos:				
Almofadas plantares	0	3 (3,1%)	4 (19%)	0
Pavilhões auriculares	0	4 (6,3%)	3 (14,3%)	0
Fígado	0	3 (3,1%)	0	0
Baço	0	4 (6,3%)	0	0
Almofadas plantares e pavilhões auriculares	0	2 (3,1%)	2 (9,5%)	0
Almofadas plantares e fígado	0	0	0	0
Almofadas plantares e baço	0	0	0	0
Pavilhões auriculares e fígado	0	4 (6,3%)	0	0
Pavilhões auriculares e baço	0	1 (1,6%)	0	0
Fígado e baço	0	4 (6,3%)	0	0
Pavilhões auriculares, almofadas plantares e fígado	2 (67%)	2 (3,1%)	0	0
Pavilhões auriculares, fígado e baço	0	6 (9,4%)	0	0
Pavilhões auriculares, almofadas plantares e baço	1 (33%)	3 (4,7%)	0	0
Todos os tecidos	0	1 (4,8%)	0	0

3.8.4. Centro iraniano (Akhavan, Mirhendi, Khamesipour, Alimohammadian, Rassi, Bates, Kamhawi, Valenzuela, Arandian, Abdoli, Jalali-zand, Jafari, Shareghi, Ghanei & Yaghoobi-Ershadi, 2010).

Em 3 distritos endêmicos para leishmaniose cutânea no centro do Irão, foi realizado outro estudo, visando a identificação das espécies de *Leishmania* presentes no principal hospedeiro, *Rhombomys opimus*. Entre Outubro de 2006 e Outubro de 2008 em Borkhar, Sezji e Badrood, 95 roedores desta espécie foram capturados.

Fragmentos de pele provenientes do pavilhão auricular foram analisados por análise parasitológica e PCR.

Um total de 22,1% (n=21) apresentaram resultado positivo na análise parasitológica e 20% (n=19) foram positivos a PCR. Relativamente a espécies, 3,2% (n=3) dos roedores estavam infectados com *Leishmania major*, 1,1% (n=1) com *Leishmania gerbilli* e 27,4% (n=26) com *Leishmania turanica*. Apuraram ainda infecção cruzada de *Leishmania major* e *Leishmania turanica* em 15,8% (n=15) dos roedores, *Leishmania major* e *Leishmania gerbilli* em 1,1% (n=1), e 2,1% (n=2) dos roedores infectados com as três espécies. Os animais não apresentaram quaisquer lesões cutâneas no pavilhão auricular.

As prevalências para todos os estudos de infecção natural por *Leishmania* em roedores silvestres compilados estão representadas na tabela 8.

Tabela 8 – Prevalências, espécies de roedores e espécies de *Leishmania* nos estudos de infecção natural compilados (baseado em Oliveira *et al.*, 2005; Neiva, 2005; Melo, 2008; Júnior, 2010; Zulueta *et al.*, 1999; De Lima *et al.*, 2002; Canto-Lara *et al.*, 1999; Psaroulaki *et al.*, 2010; Di Bella *et al.*, 2003; Papadogiannakis *et al.*, 2009; Mohebbi *et al.*, 2004; Pourhohammadi *et al.*, 2008; Motazedian *et al.*, 2010; Parhizkari *et al.*, 2011 & Akhavan *et al.*, 2010).

País	Estado/Distrito/Cidade/Localidade	Espécie(s) de roedores/nº	Prevalência	Espécie(s) de <i>Leishmania</i>
Brasil	Estado de Minas Gerais - Ponte do Gravatá (2005)	<i>Rattus rattus</i> (21) <i>Thricomys apereoides</i> (18) <i>Oryzomys subflavus</i> (13)	19%, 4,7%, 4,7% 27,7%, 11,1% 7,6%	<i>L. mexicana</i> , <i>L. chagasi</i> , <i>L. braziliensis</i> <i>L. mexicana</i> , <i>L. chagasi</i> <i>L. braziliensis</i>
Brasil	Estado de Minas Gerais – Belo Horizonte (2005)	<i>Rattus norvegicus</i> (98)	64,3%	<i>L. amozenensis</i>
Brasil	Estado de Minas Gerais – Belo Horizonte (2008)	<i>Bolomys lasiurus</i> (4) <i>Didelphis albiventris</i> (33) <i>Didelphis aurita</i> (1) <i>Galictis</i> sp. (2) <i>Mus musculus</i> (22) <i>Oryzomys subflavus</i> (5) <i>Rattus norvegicus</i> (9) <i>Rattus rattus</i> (19)	25% 21% 100% 100% 27% 40% 5% 26%	<i>Leishmania</i> sp.
Brasil	Estado de Pernambuco Município de Imbú (2010)	<i>Nectomys squamipes</i> (98) <i>Rattus rattus</i> (49) <i>Necromys lasiurus</i> (12) <i>Holochilus sciureus</i> (9) <i>Oryzomys subflavus</i> (3) <i>Galea spixii</i> (3)	35,7% 40,8% 16,7% 44,4% 33,3% 35,6%	<i>Leishmania</i> sp.
Venezuela	Estado de Anzoátegui (1999)	<i>Rattus rattus</i> (2) <i>Sigmodon hispidus</i> (8)	50% 12,5%	<i>L. donovani</i> <i>Leishmania</i> sp.
Venezuela	Estado de Lara – La Matica (2002)	<i>Rattus rattus</i> (68)	41,1%	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>Leishmania</i> sp.
México	Estado de Campeche La Libertad (1999)	<i>Ototylomys phyllotis</i> (6) <i>Oryzomys melanotis</i> (8) <i>Peromyscus yucatanicus</i> (5) <i>Sigmodon hispidus</i> (2)	100%	<i>L. mexicana</i>
Chipre	Totalidade do País (2010)	<i>Rattus rattus</i> (152) <i>Rattus norvegicus</i> (344)	11,2% 5,6%	<i>L. infantum</i>

Tabela 8 (continuação).

País	Estado/Distrito/Cidade/ Localidade	Espécie(s) de roedores/nº	Prevalência	Espécie(s) de <i>Leishmania</i>
Itália	Calábria e Sicília (2003)	<i>Rattus rattus</i> (28) <i>Rattus norvegicus</i> (9) <i>Mus musculus</i> (17)	59% 33,3% 5,8%	<i>L. infantum</i>
Grécia	Atenas e Piareus (2009)	<i>Rattus norvegicus</i> (16)	6,3%	<i>L. infantum</i>
Irão	Totalidade da República (2004)	<i>Rhombomys opimus</i> (100) <i>Meriones libycus</i> (153) <i>Tatera indica</i> (203) <i>Meriones hurrianae</i> (28) <i>Mesocricetus auratus</i> (2) <i>Meriones persicus</i> (394)	42%, 1% 30% 5,9% 17,9% 50% 0,25%, 16,7%	<i>L. major</i> , <i>L. turanica</i> <i>L. major</i> <i>L. major</i> <i>L. major</i> <i>L. infantum</i> <i>L. donovani</i> , <i>Leishmania</i> sp.
Irão	Norte (2008)	<i>Nesokia indica</i> (298) <i>Meriones libycus</i> (29)	61,4% 51,7%	<i>L. major</i> <i>L. major</i>
Irão	Sul – Província de Fars (2010)	<i>Rattus norvegicus</i> (57)	58,8%	<i>L. major</i>
Irão	Sul – Província de Fars (2011)	<i>Meriones persicus</i> (3) <i>Tatera indica</i> (64) <i>Mus musculus</i> (21)	100% 54,7% 42,9%	<i>L. major</i>
Irão	Centro (2010)	<i>Rhombomys opimus</i> (95)	3,2%, 1,1%, 27,4%	<i>L. major</i> , <i>L. gerbilli</i> , <i>L. turanica</i>

4. Estudos de infecção experimental por *Leishmania* em roedores silvestres

4.1. Itália

4.1.1. Ensaio 1 (Gradoni, Pozio, Gramiccia, Maroli & Bettini, 1983).

No Instituto Superiore di Sanità em Roma, em 1983, foi efectuado um ensaio para apurar o papel dos roedores da espécie *Rattus rattus* na epidemiologia da infecção por *Leishmania infantum*.

Foram capturados 27 exemplares, em Monte Argentario, Toscana. Foram realizados testes de IFAT para descartar a hipótese de infecção natural. Do total de 27 roedores, 22 foram divididos em grupos de 4 a 5 espécimes e foram posteriormente inoculados por via endovenosa ou subcutânea com uma suspensão de amastigotas de *Leishmania infantum* provenientes de um exemplar de *Rattus rattus* infectado em condições naturais. Os restantes cinco roedores foram inoculados por via subcutânea com 1 ml de suspensão de promastigotas provenientes de cultura. A carga parasitária foi avaliada por concentração amastigota nas análises parasitológicas de baço após esplenectomia parcial. Colheitas de sangue para IFAT foram efectuadas a partir da veia retro-orbital.

Foi também medida a atracção dos flebotomíneos pelos roedores em condições naturais. Para este efeito, gaiolas com roedores e com óleo vegetal na superfície superior visando capturar os insectos vectores foram colocadas durante o final do dia em vários locais. Foram colocadas também gaiolas vazias para controlo. As gaiolas foram estrategicamente colocadas em áreas específicas, domésticas e rurais.

Fêmeas de flebotomíneos não ingurgitadas foram recolhidas e colocadas numa gaiola de rede. Os roedores foram então expostos aos insectos, após anestesia e tricotomia abdominal. Cinco horas após o início da exposição, as fêmeas ingurgitadas foram recolhidas e colocadas em recipientes de vidro cobertos com gaze e dissecadas 6 dias depois.

Os resultados da infecção experimental dos roedores indicaram uma descida da carga parasitária no baço da maioria dos animais ao longo do tempo. Em apenas um caso ocorreu um aumento da carga parasitária durante os 100 primeiros dias. Nenhuma forma amastigota foi visualizada após cinco meses e nenhum sinal de doença ocorreu. Os títulos de presença de *Leishmania* nos testes de IFAT subiram em todos os animais até ao 5º mês, e decresceram gradualmente a partir do décimo mês, até atingirem os valores iniciais por volta do 16º mês. Nenhum dos ratos inoculados com promastigotas apresentou parasitas no baço, ou anticorpos específicos.

Relativamente à atracção dos flebótomos aos roedores, apenas as gaiolas com roedores permitiram capturar flebotomíneos. As espécies dos insectos capturados foram *Phlebotomus perfiliewi* e *Phlebotomus perniciosus*.

Relativamente aos ensaios de infecciosidade, foram utilizados quatro roedores. Dois foram sujeitos a infecção experimental recente (roedor 1 e roedor 2 com cargas parasitárias baixa e alta, respectivamente), enquanto os restantes dois (roedor 3 e roedor 4) foram inoculados 15 meses antes. Estes últimos não apresentavam carga parasitária, mas apresentavam titulações altas a IFAT (1/80 para o roedor 3 e 1/160 para o roedor 4). Durante o 14º mês, foi administrado acetato de cortisona ao roedor 4 na dose 200mg/Kg cinco vezes por dia durante 15 dias.

Apenas os flebótomos que se alimentaram dos roedores 2 e 4 desenvolveram infecção. O rácio de infecção *Phlebotomus perfiliewi*/*Phlebotomus perniciosus* foi de 1:3,6 no roedor 2 e 1:10,8 no roedor 4.

4.1.2. Ensaio 2 (Pozio, Maroli, Gradoni & Gramiccia, 1985).

No mesmo instituto em 1985, foi realizado um ensaio de infecção experimental por *Leishmania infantum* na espécie *Rattus rattus* pelo vector *Phlebotomus perniciosus*.

Foi utilizada a mesma estirpe de *Leishmania infantum* do ensaio anterior proveniente do mesmo exemplar de *Rattus rattus* naturalmente infectado. Os promastigotas foram colhidos após 15 dias de cultura de baço.

Quatro espécimes de *Rattus rattus* foram capturados em Monte Argentario, Tuscânia. O soro dos animais foi analisado por IFAT de forma a excluir infecção natural.

A colônia de flebotomíneos de 20ª geração utilizada foi estabelecida por um dos autores em laboratório a partir de ovos colhidos de fêmeas grávidas capturadas em Tuscânia. As fêmeas foram divididas em dois grupos e alimentadas com sangue de coelho desfibrinado. As fêmeas do grupo A foram alimentadas com sangue contendo uma suspensão de promastigotas e as fêmeas do grupo B foram alimentadas com sangue contendo uma suspensão de amastigotas.

Os roedores foram anestesiados e expostos aos flebotomíneos. O roedor 1 foi exposto a duas fêmeas e o roedor 4 foi exposto a outras duas, pertencentes ao grupo A. O roedor 2 foi exposto a duas e o roedor 3 a seis, pertencentes ao grupo B. Todas as 12 fêmeas foram dissecadas após a refeição e 11 revelaram infecções massivas no intestino médio. Apenas uma, que se alimentou do roedor 2, revelou fraca infecção com pequena quantidade de promastigotas.

Os roedores 1 e 4 foram positivos a IFAT nas titulações 1/40 e 1/80 respectivamente, 25 e 33 dias após a picada, Os roedores 2 e 3 não revelaram positividade durante um período de seis meses.

Acetato de cortisona na dose 200mg/Kg seis vezes ao dia foi administrado ao roedor 1 durante dezoito dias, 163 dias após a picada e com uma titulação positiva de 1/160 a IFAT. Cento e oitenta e dois dias depois da picada, 67 espécimes de *Phlebotomus perniciosus* foram induzidos a alimentar-se do roedor. Quatro insectos (5,9%) demonstraram infecção no intestino médio após dissecação. O roedor 3 foi exposto a 160 flebotomíneos 165 dias depois da picada, também com uma titulação positiva de 1/160 a IFAT. Nenhum dos flebotomíneos demonstrou infecção.

4.2. Turquia (Svobodová, Votýpka, Nicolas & Volf, 2003).

Na Turquia foi também realizado um estudo de infecção experimental na espécie *Rattus rattus* com a espécie antroponótica *Leishmania tropica*. Dois isolados de *Leishmania tropica* de zimodeme MON-53, colhidos de pacientes turcos da Anatólia do Sul que padeciam de leishmaniose cutânea foram submetidos a crescimento em cultura.

Espécimes de *Rattus rattus* foram capturados e foi criada uma colônia de reprodução. Dez exemplares da primeira geração foram utilizados na infecção experimental. Após anestesia, os autores procederam à inoculação intra-dérmica de promastigotas no pavilhão auricular de um animal e na pata de outro, em grupos de dois, num total de 5 grupos. Os animais foram sacrificados ao fim de 1, 3, 6, 9 e 12 meses após a inoculação. Amostras de tecido do local de inoculação, linfonodo eferente, fígado e baço foram submetidas a cultura e analisadas semanalmente durante um mês. Foi também realizado RT-PCR a amostras de sangue, fígado, baço, medula óssea femoral, cauda, e pavilhões auriculares esquerdo e direito para medir a disseminação da infecção e a carga parasitária em períodos até 24 meses pós inoculação.

A colônia de *Phlebotomus sergenti* foi estabelecida em 1998 a partir de cerca de 200 fêmeas capturadas em armadilhas luminosas. Duas vezes por semana as fêmeas puderam alimentar-se de um roedor anestesiado.

Na experiência, os roedores anestesiados foram colocados em contacto com uma parte das fêmeas da colônia, com apenas os locais de inoculação expostos. Nove dias depois as fêmeas foram dissecadas e o intestino foi observado ao microscópio com o intuito de visualização de promastigotas.

Os resultados referem a inexistência de quaisquer lesões ou alterações cutâneas. No entanto, parasitas viáveis foram isolados novamente 1, 3, 6, 9 e 12 meses após a inoculação nos 10 animais. Em apenas um dos casos foi possível o isolamento a partir de um linfonodo eferente proveniente de um animal inoculado no pavilhão auricular. As culturas de fígado e baço foram negativas. Relativamente à capacidade infectante para os insectos, apenas os animais que foram inoculados no pavilhão auricular transmitiram o agente. Todas as fêmeas dissecadas, à excepção de uma, apresentaram infecção massiva com mais de 1000 promastigotas. Estes concentravam-se no intestino médio torácico e na válvula estemodeal. As percentagens de infecção estão representadas na tabela 9.

Tabela 9 – Percentagem de infecção em *Phlebotomus sergenti* após alimentação nos locais de inoculação em *Rattus rattus* (baseado em Svobodová *et al.*, 2003).

Meses pós-inoculação	Dissecadas (n°)	Infectadas (n°)	Infectadas (%)
1	6	1	0,2
2	56	0	0
2	69	2	2,9
2	139	3	2,2
3	45	0	0
3	166	12	7,2
5	41	1	2,4
6	22	1	4,5
21	222	4	1,8
24	171	3	1,8
Total	937	27	2,9

O teste de RT-PCR que visava medir a carga parasitária e a disseminação da infecção permitiu concluir que, apesar de ocorrerem diferenças entre os animais, ocorreu de uma forma geral uma persistência de longa duração de ADN parasitário no local da inoculação, até 24 meses. A carga parasitária no pavilhão auricular inoculado nos diferentes intervalos de tempo está apresentada na tabela 10. Das amostras de sangue, fígado, baço, medula óssea femoral, cauda e

pavilhões auriculares esquerdo e direito, apenas os pavilhões auriculares e cauda continham ADN parasitário. A carga parasitária na cauda variou de $7,5 \times 10^3$ a 6×10^4 por cm^2 .

Tabela 10 – Carga parasitária no pavilhão auricular inoculado em diferentes intervalos de tempo (baseado em Svobodová *et al.*, 2003).

Meses pós-inoculação	Número de roedores	Parasitas / pavilhão auricular
1	2	$1,3 \times 10^5$
		$1,2 \times 10^6$
2	2	$6,7 \times 10^5$
		$4,1 \times 10^3$
3	2	$1,0 \times 10^5$
		$6,0 \times 10^4$
10	1	$7,6 \times 10^3$
16	1	$9,6 \times 10^4$
18	1	$6,8 \times 10^5$
24	1	$5,1 \times 10^4$

5. Avaliação do papel dos roedores das espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* como hospedeiros reservatórios de *Leishmania infantum* nos concelhos de Sesimbra e Sintra.

5.1. Objectivos

Os objectivos deste trabalho foram:

- 1) A pesquisa de infecção por amastigotas de *Leishmania* sp. através do exame parasitológico e histopatológico e detecção do ADN do parasita por RT-PCR em 30 exemplares das espécies *Rattus norvegicus* e *Mus musculus* capturados entre Maio e Outubro de 2011 em dois concelhos, nos concelhos de Sintra e Sesimbra;
- 2) A análise da prevalência da infecção por *Leishmania* sp. nas populações estudadas;
- 3) A avaliação dos factores de risco de transmissão aos canídeos e seres humanos.

5.2. Material e métodos

5.2.1. Material

5.2.1.1. Biologia dos roedores

5.2.1.1.1. *Rattus norvegicus*

O rato da Noruega (Figura 14), vulgarmente conhecido como ratazana, é um roedor de grande porte podendo atingir os 600 g de peso, 22 cm de comprimento total corporal e 25 cm de cauda.

Figura 14 – Exemplar da espécie *Rattus norvegicus* (fonte: <http://www.pbase.com/tmurray74/image/37852067>).



A sua pelagem é castanha, o focinho é arredondado e os seus pavilhões auriculares são proporcionalmente pequenos, com uma média de 2 cm de comprimento. Pertence à ordem Rodentia e família Muridae. É omnívoro, preferindo ovos, carne e frutas e vive em colónias

escavando galerias subterrâneas em locais onde facilmente obtém alimento e abrigo. É capaz de percorrer grandes distâncias mas habitualmente o seu raio de acção não ultrapassa os 50 metros. É em condições normais neofóbico, desconfiando de novos objectos colocados no seu ambiente. Esta tendência é inversamente proporcional ao contacto que tem com o movimento de pessoas, objectos e mercadorias. Efectivamente, quanto maior a habituação a estes estímulos, maior a sua confiança para explorar. O seu tempo médio de vida é de 24 meses. As fêmeas geram 8 a 12 ninhadas de 7 a 12 crias por ano com a duração de gestação de 22-24 dias e atingem a maturidade sexual entre os 60 e os 90 dias (Ministério da Saúde, 2002).

5.2.1.1.2. *Mus musculus*

O murganho (Figura 15), também pertencente à ordem Rodentia e à família Muridae, é um roedor de pequeno porte.

Figura 15 – Exemplar da espécie *Mus musculus* (fonte: <http://www.iaszoology.com/house-mouse/>).



Habitualmente não ultrapassa os 25 g de peso e os 18 cm de comprimento incluindo a cauda. A sua pelagem é cinzenta-acastanhada, o seu focinho é afilado e os seus pavilhões auriculares são proporcionalmente grandes em relação ao seu tamanho, com um comprimento médio de 1 cm. É omnívoro, com especial preferência por grãos e sementes e vive também em colónias onde obtenha alimento e abrigo, escavando galerias no subsolo. O seu raio de acção é de cerca de 3 metros. Pode também ser encontrado em ambiente intra-domiciliar construindo ninhos na base de armários ou gavetas com pouca utilização. Apesar de não apresentar neofobia e ser um activo e minucioso explorador, a sua presença é apenas detectada quando a população atinge número considerável. O seu tempo médio de vida é de 12 meses. As fêmeas geram 5 a

6 ninhadas de 3 a 8 crias por ano com duração de gestação de 19-21 dias e atingem a maturidade sexual entre os 42 e os 45 dias (Ministério da Saúde, 2002).

5.2.1.2. Caracterização dos locais de recolha da amostra

Os animais testados provieram de dois diferentes canis em diferentes locais: arredores da aldeia de Meleças, no concelho de Sintra e Pinhal do Cabedal, Carrasqueira, nos arredores de Sesimbra.

5.2.1.2.1. Canil de Meleças

O meio envolvente do albergue de Meleças caracteriza-se pela existência de vegetação rasteira, sobreiros, oliveiras e algumas árvores de fruto (Figura 16). Contém um pequeno curso de água proveniente de uma pequena nascente que atravessa o terreno e apresenta acumulação em determinados locais (Figura 17).

A maioria do espaço reservado ao albergue insere-se em pavimento de terra batida e campo aberto com casotas de cimento pré-fabricadas. Em determinados locais existem pátios pavimentados em cimento. Existem ainda locais com boxes construídas em alvenaria, tecto em telha lusa. A entrada é constituída por vedação metálica.

No albergue de Meleças existem cerca de 215 canídeos. Do total, 5 (2,3%) estão em tratamento para leishmaniose clínica.

Figura 16 – Vegetação presente no canil de Meleças (original).



Figura 17 – Acumulação de água estagnada no canil de Meleças (original).



5.2.1.2.2. Canil de Sesimbra

O canil nos arredores de Sesimbra (Figura 18) insere-se numa clareira envolta em pinhal e vegetação rasteira (Figura 19). Situa-se a 50 metros de uma estação de transferência de resíduos sólidos urbanos e a cerca de 12 km da lagoa de Albufeira.

A implantação foi realizada em terreno de terra batida. As boxes são constituídas por paredes a meia-altura, telhado em fibrocimento e vedação de rede. Existem também animais em casotas de cimento pré-fabricadas. A periferia do albergue é composta por rede metálica.

Neste espaço existem cerca de 230 canídeos. Um total de 12 (5,2%), desenvolveram leishmaniose clínica e encontram-se em tratamento.

Figura 18 – Canil nos arredores de Sesimbra (original).



Figura 19 – Ambiente circundante do canil localizado nos arredores de Sesimbra (original).



5.2.1.3. Caracterização do clima dos concelhos de Sintra e de Sesimbra

O concelho de Sintra, com a sua conhecida diversidade de território, estende-se por uma área de superfície de 320 km². Está limitado a norte pelo concelho de Mafra, a sul pelos concelhos de Cascais e Oeiras, a este pelos concelhos de Loures, Odivelas e Amadora e a oeste pelo Oceano Atlântico.

O seu clima é temperado mediterrânico devido à influência atlântica, conferindo esta, amplitudes térmicas moderadas. Diferentes tipos de ambientes existem em Sintra: zona costeira, serra, vale, várzea e zona urbana. Esta variedade de ambientes confere características peculiares que se traduzem em três principais microclimas: na costa verifica-se amenidade na temperatura devido às características físicas do mar e consequentemente a atenuação dos extremos e amplitudes térmicas; a serra age como barreira de condensação dos ventos, ocorrendo a formação de neblina, o nível de precipitação aumenta e a temperatura baixa; nas zonas urbanas, como é o caso da aldeia de Meleças, ocorrem as denominadas “ilhas de calor” devido à substituição dos solos naturais por materiais artificiais, absorvendo o calor do sol e reflectindo-o (Carvalho, 2009).

O concelho de Sesimbra é limitado a este pelo concelho de Setúbal, a norte pelos concelhos de Almada, Seixal e Barreiro e a oeste pelo Oceano Atlântico. Estende-se por uma área de superfície de 195 km² e está inserido na península de Setúbal. O seu clima é também temperado mediterrânico (Comissão Municipal de Defesa Contra Incêndios de Palmela, Setúbal e Sesimbra, 2007). A Serra da Arrábida, estendendo-se ao longo de 35 km, protege o concelho contra os ventos frescos do norte conferindo amenidade na temperatura.

Ambos os concelhos pertencem à área pluviométrica do sul com níveis médios de precipitação inferiores a 800 mm, repartidos por 90 dias do ano. Na Serra de Sintra são atingidos os 1000 mm médios repartidos por 110 dias do ano (Pereira, 2003).

5.2.2. Métodos

5.2.2.1. Exame de necrópsia e recolha de material biológico

Os 30 animais foram submetidos a necrópsia para recolha de material biológico após o exame macroscópico e caracterização da espécie, do sexo, da pesagem, da determinação do escalão etário e da medição do comprimento total, da cabeça, do pavilhão auricular e da cauda.

O exame macroscópico consistiu na verificação da existência de lesões cutâneas, alopecia e soluções de continuidade da pele no corpo e na cauda.

A pesagem foi efectuada em balança digital com sensibilidade à grama e peso máximo admissível de 2 kg.

Foram efectuados os registos dos dados biométricos, representados no anexo 2. Foram definidos os escalões etários: juvenil e adulto, apurados com base na dimensão e peso.

Após a abertura e exame visual da cavidade abdominal, com o auxílio de uma tesoura e de uma pinça, foram recolhidos fragmentos de fígado e baço e realizados esfregaços por aposição. Os fragmentos foram posteriormente colocados em recipientes contendo formol a 10% para posterior exame histopatológico. Adicionalmente, fragmentos de baço e pele de pavilhão auricular foram colhidos para tubos *ependorf* contendo RNAlater®, a fim de preservar o ADN para a realização do exame por RT-PCR. Fragmentos de pele de ambos os pavilhões auriculares foram colhidos utilizando um bisturi excepto em dois animais, um de cada espécie, em que foram colhidos fragmentos de lesões suspeitas na cauda detectadas aquando do exame macroscópico (Figuras 20 e 21). Todas as alterações orgânicas observadas e registadas estão documentadas no anexo 3.

Foi utilizado material descartável por cada colheita de forma a não ocorrer contaminação por outros agentes biológicos ou ADN.

Numa fase posterior, foram colhidos fragmentos de fígado com a finalidade da realização de exame por RT-PCR em 20 cadáveres congelados da espécie *Mus musculus*. Os fragmentos foram colhidos segundo o mesmo procedimento utilizado para as colheitas de pele de pavilhão auricular e de baço.

Figura 20 – Lesão na cauda em espécime de *Rattus norvegicus* (original).



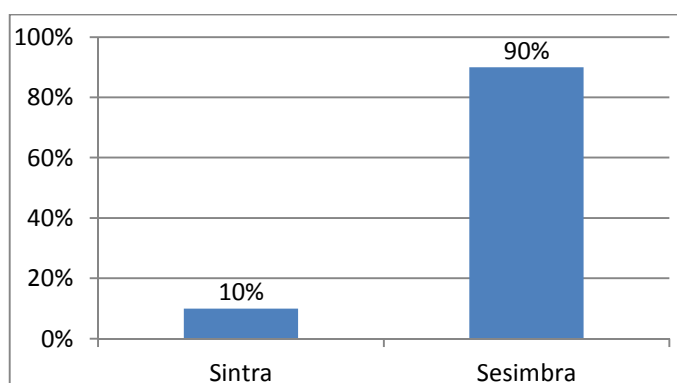
Figura 21 – Lesão na cauda em espécime de *Mus musculus* (original).



5.2.2.2. Caracterização das populações em estudo

Os 30 roedores estudados pertencem às espécies *Rattus norvegicus* e *Mus musculus*. Os exemplares da espécie *Rattus norvegicus* (n=3) foram oriundos de Sintra, enquanto os espécimes de *Mus musculus* (n=27) foram originários de Sesimbra, por constituírem as populações residentes nos locais de recolha da amostra (Gráfico 3).

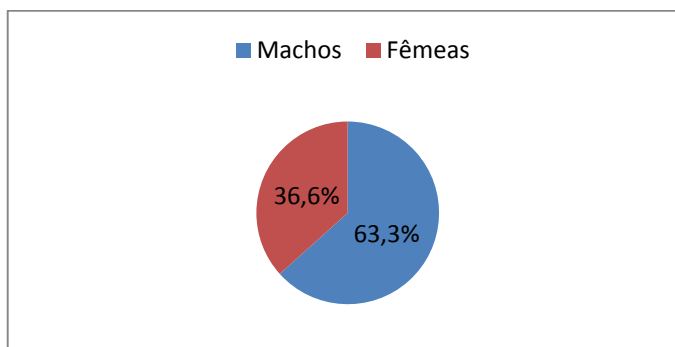
Gráfico 3 – Proveniência da totalidade da amostra de roedores por concelho.



Ambos os albergues contemplam no seu procedimento habitual o controlo da população de roedores através da captura e morte. Não ocorreu em nenhum caso ingestão de rodenticidas. Os animais já se apresentavam mortos aquando da entrega ao autor.

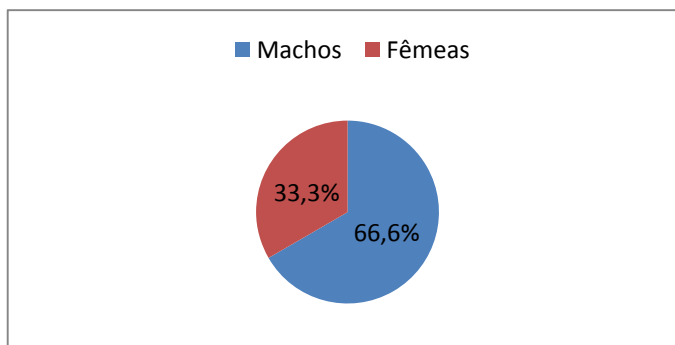
Da totalidade dos animais testados, 36,6% (n=11) eram fêmeas enquanto 63,3% (n=19) eram machos (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Distribuição por sexo na totalidade da amostra.



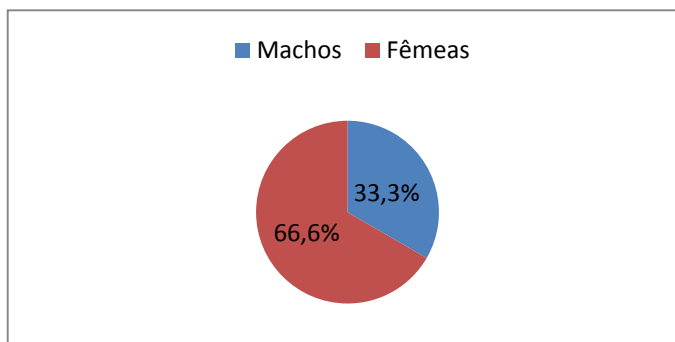
Na amostra de roedores da espécie *Mus musculus*, 33,3% (n=9) pertenciam ao sexo feminino enquanto 66,6% (n=18) pertenciam ao sexo masculino (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Distribuição por sexo na amostra da espécie *Mus musculus*.



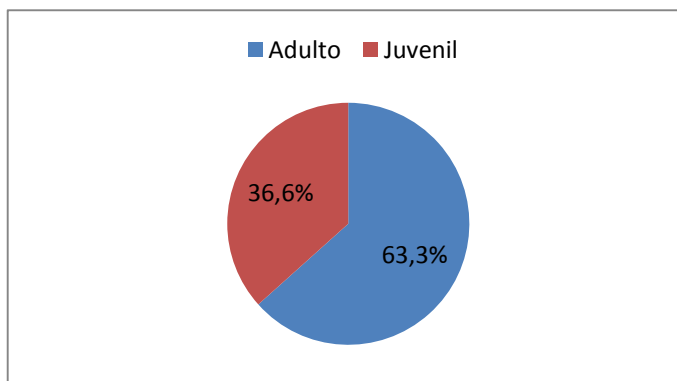
Considerando a espécie *Rattus norvegicus*, 66,6% (n=2) eram fêmeas e 33,3% (n=1) eram machos (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Distribuição por sexo na amostra da espécie *Rattus norvegicus*.



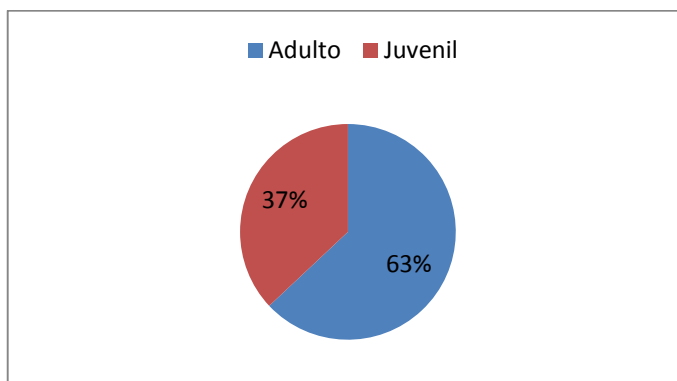
Em relação ao escalão etário, no total, 63,3% (n=19) eram adultos enquanto 36,6% (n=11) pertenciam ao escalão juvenil (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Classificação do escalão etário da totalidade da amostra.



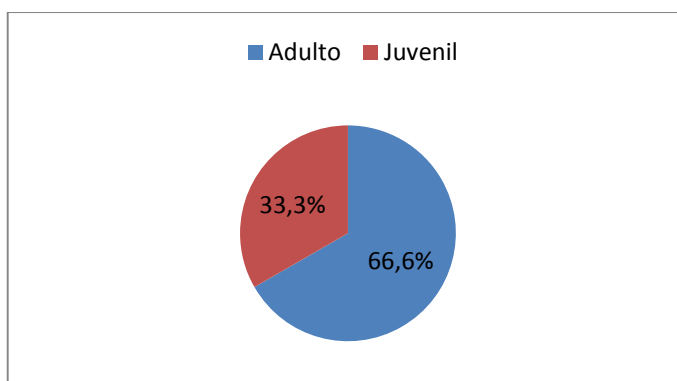
Relativamente à distribuição etária, na espécie *Mus musculus*, 63% (n=17) eram adultos e 37% (n=10) eram juvenis (Gráfico 8).

Gráfico 8 – Classificação do escalão etário na amostra de *Mus musculus*.



Na espécie *Rattus norvegicus*, 66,6% (n=2) eram adultos e 33,3% (n=1) eram juvenis (Gráfico 9).

Gráfico 9 – Classificação do escalão etário na amostra de *Rattus norvegicus*.



O peso variou entre os 11 g e os 30 g para os exemplares de *Mus musculus* e entre os 66 g e os 419 g para os exemplares de *Rattus norvegicus*. A média do peso foi de 19 g e 273 g para as duas espécies, respectivamente.

5.2.2.3. RT-PCR

5.2.2.3.1. Extracção de ADN

Após a recolha dos fragmentos de baço e pele e posterior armazenamento em RNAlater®, foi realizada a extracção de ADN utilizando o kit DNeasy *blood and tissue* e o protocolo *Animal tissues – spin – column protocol* da Qiagen®. Após a maceração das amostras em almofariz esterilizado em tampão de lise (*buffer ATL*), foi utilizada a enzima proteinase K, com a finalidade de promover a digestão proteica. Após a incubação com a duração de 3 horas, foi utilizado um tampão de lise celular (*buffer AL*) e etanol 100% para precipitação de ADN. Após a utilização de dois tampões de lavagem (*buffers AW1 e AW2*), procedeu-se à eluição do ADN em tampão de eluição (*buffer AE*).

5.2.2.3.2. Quantificação de ADN

A quantificação foi efectuada no espectofotómetro Nanodrop 2000 da Thermo Fisher Scientific®. Para as amostras de pele de pavilhão auricular o menor valor quantificado foi de 25,7 ng/μl, o maior foi de 265,2 ng/μl e a média correspondeu a um valor de 61,5 ng/μl. Para as amostras de baço e fígado, o menor valor quantificado foi de 49,2 ng/μl e 109,2 ng/μl, o maior foi de 695,5 ng/μl e 501,7 ng/μl e a média correspondeu a um valor de 273,5 ng/μl e 227,4 ng/μl respectivamente. Os valores de quantificação de ADN das amostras utilizadas estão representados no anexo 4.

5.2.2.3.3. Realização do RT-PCR

O RT-PCR foi realizado pelo laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV/UTL) de acordo com a metodologia utilizada para o diagnóstico de infecções por *Leishmania*.

A reacção foi efectuada utilizando a TaqMan Gene Expression Master Mix (2X) da Applied Biosystems®, 900 nM de primers e 250 nM de sonda TaqMan. O termociclador utilizado foi o modelo 7300 da Applied Biosystems®. O ciclo de amplificação consistiu num passo de activação da DNA polimerase a 95° durante 10 minutos seguido de um conjunto de 50 ciclos de 90° durante 15 segundos e 60° durante um minuto. Foram efectuados dois testes para cada amostra. A quantidade de ADN utilizada foi de 50 ng para o primeiro teste e de 5 ng para o segundo teste.

Não ocorreram reacções cruzadas com nenhum agente etiológico dos géneros *Babesia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* ou *Rickettsia*.

A quantificação da carga parasitária foi obtida através da curva de calibração efectuada pelo termociclador, com base na correlação dos *threshold cycles* e do número de moléculas de cada diluição seriada do plasmídeo recombinante, obtida através da fórmula

$$\text{N}^{\circ} \text{ moléculas} = \frac{\text{Peso em g}}{660 (\text{PM bp}) \times \text{bp recombinante}} \times 6,022 \times 10^{23}.$$

5.2.2.4. Exame parasitológico

O exame parasitológico dos fragmentos de fígado e baço foi efectuado após a realização dos esfregaços por aposição com impressões sucessivas até esgotamento completo, de cada fragmento, em cada lâmina. Após secagem ao ar, as lâminas foram fixadas com metanol durante um minuto e coradas com o corante de Giemsa na diluição de 1:10 em água destilada, também durante um minuto. Após a lavagem das lâminas em água corrente visando a remoção do excesso de corante, as mesmas foram submetidas a secagem sobre papel de filtro. Foram posteriormente observadas ao microscópio óptico na ampliação de 1000x.

5.2.2.5. Exame histopatológico

Após a recolha dos fragmentos de fígado e baço e posterior armazenamento em recipientes de recolha contendo formol a 10%, os cortes histológicos foram realizados pelo sector de Anatomia Patológica da FMV/UTL e corados com os corantes Giemsa e Hematoxilina-eosina. Este último foi utilizado devido a dificuldades de visualização das formas amastigotas em cortes corados com o corante de Giemsa.

5.2.2.5.1. Cortes histológicos corados com Giemsa

O exame histopatológico das lâminas coradas com o corante de Giemsa foi realizado após execução dos cortes dos órgãos em micrótomo, em finas secções parafinadas de 3 µm. Após a desparafinação e re-hidratação com álcool e água, os cortes foram corados com o corante de Giemsa a 4% “overnight”. Após a coloração, os cortes foram lavados com água destilada, com ácido acético aquoso a 0,5%, com água tépida e secas por agitação ao ar. As secções foram então desidratadas através de álcool, montadas em lâminas e cobertas com lamelas. As lâminas foram posteriormente observadas ao microscópio óptico na ampliação de 1000x.

5.2.2.5.2. Cortes histológicos corados com Hematoxilina-eosina

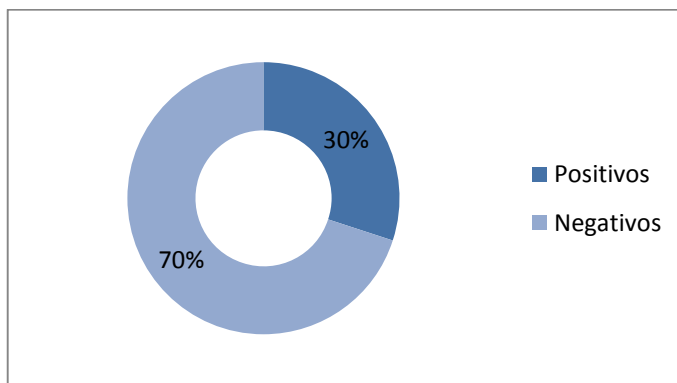
A preparação do material para exame histopatológico das lâminas coradas com o corante de Hematoxilina-eosina teve início com a execução dos cortes dos órgãos em micrótomo, em finas secções parafinadas de 3 μm . Após a desparafinação e re-hidratação com álcool e água, os cortes foram corados com o corante Hematoxilina de Gill2 durante 30 segundos. Após lavagem dos cortes com água tépida, foi efectuada a coloração com o corante de Eosina-floxina durante 1 minuto. As secções foram então desidratadas através de álcool, montadas em lâminas e cobertas com lamelas. As lâminas foram posteriormente observadas ao microscópio óptico na ampliação de 1000x.

6. Resultados

6.1. RT-PCR

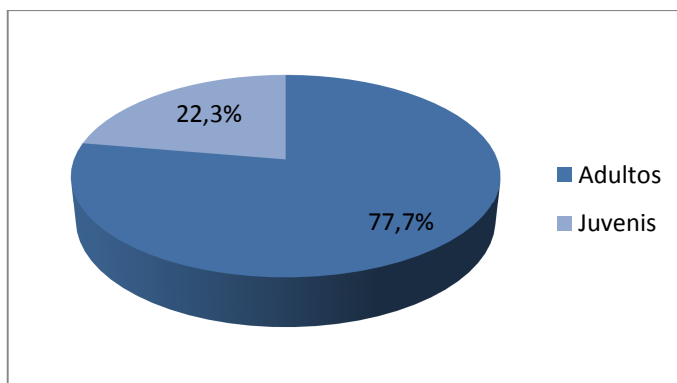
Do total de animais testados, 30% (n=9) apresentaram resultado positivo para *Leishmania* sp. no diagnóstico por RT-PCR (Gráfico 10).

Gráfico 10 – Taxa de infecção obtida por RT-PCR nos roedores testados.



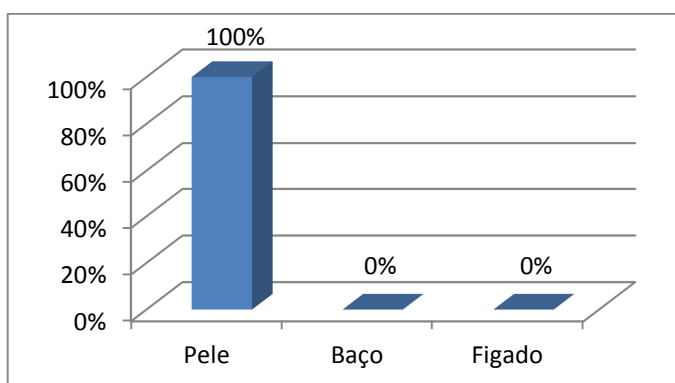
Do total dos animais infectados, 7 (77,7%) eram adultos e 2 (22,3%) eram juvenis (Gráfico 11).

Gráfico 11 – Escalão etário dos roedores positivos por RT-PCR.



Nos animais infectados, a positividade foi de 100% para as amostras de pele provenientes do pavilhão auricular enquanto todas as amostras de baço e de fígado apresentaram resultado negativo (Gráfico 12).

Gráfico 12 – Taxa de infecção obtida por RT-PCR na pele de pavilhão auricular, baço e fígado dos roedores testados.



Todos os animais infectados pertenciam à espécie *Mus musculus* (Gráfico 13). Para esta espécie, a prevalência apurada foi de 33,3% (Gráfico 14).

Gráfico 13 – Taxa de infecção obtida por RT-PCR nas duas espécies de roedores.

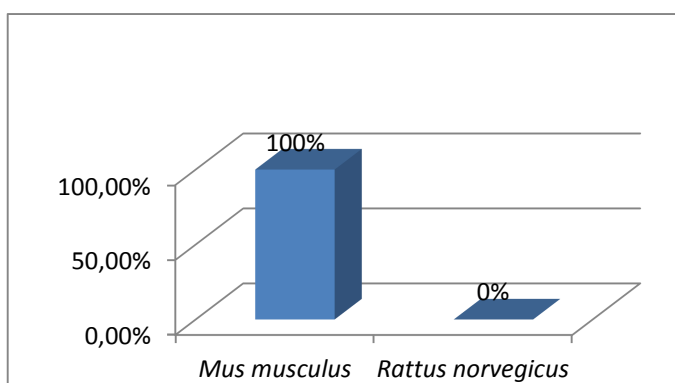
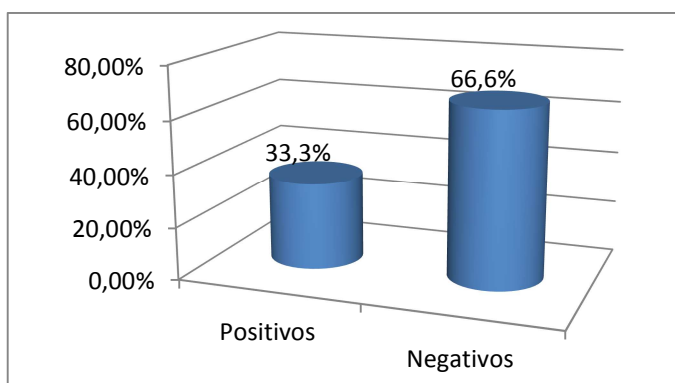


Gráfico 14 – Taxa de infecção obtida por RT-PCR na espécie *Mus musculus*.



As cargas parasitárias encontradas nos fragmentos de pele positivos estão apresentadas na tabela 11.

Tabela 11 – Carga parasitária nas amostras de pavilhão auricular dos animais positivos por RT-PCR.

Roedor (nº espécime)	Carga parasitária (cópias)
Nº5	72
Nº6	50
Nº10	100
Nº13	393
Nº19	50
Nº24	Residual
Nº27	Residual
Nº29	Residual
Nº30	Residual

6.2. Exame parasitológico

Na análise parasitológica, 20% (n=6) dos animais testados apresentaram resultado positivo para a amostra observada (Gráfico 15): um espécime juvenil de *Rattus norvegicus* (33,3%) e cinco espécimes (três adultos e dois juvenis) da espécie *Mus musculus* (18,5%). A taxa de infecção de ambas as espécies estudadas está representada no gráfico 16. O escalão etário dos roedores infectados está representado no gráfico 17.

Gráfico 15 – Taxa de infecção no exame parasitológico no total dos roedores testados.

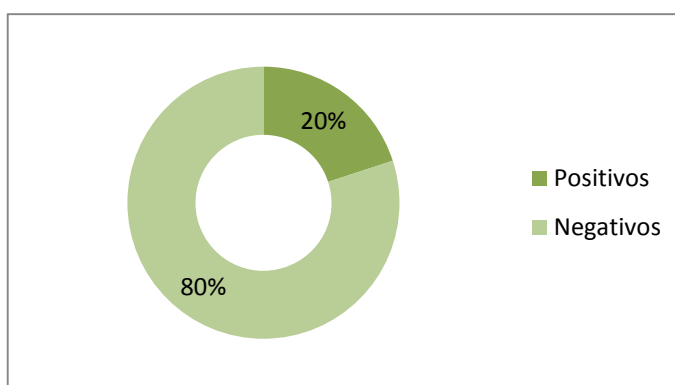


Gráfico 16 – Taxa de infecção por espécie no exame parasitológico.

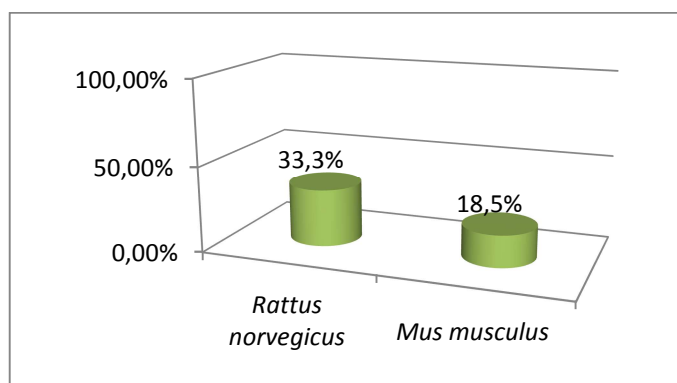
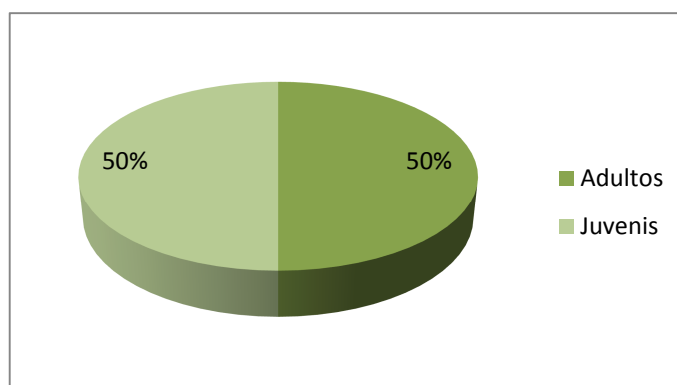


Gráfico 17 – Escalão etário dos roedores positivos no exame parasitológico.



Do total de 6 animais positivos no exame parasitológico, apenas o exemplar de *Rattus norvegicus* e dois exemplares de *Mus musculus* demonstraram positividade no fígado e no baço, enquanto os restantes três *Mus musculus* apenas expressaram resultado positivo no fígado. Do total de animais positivos, 50% apresentaram formas amastigotas no baço (Figura 22) enquanto no fígado (Figura 23) o resultado obtido foi de 100% (Gráfico 18).

Figura 22 – Forma amastigota no exame parasitológico de baço de roedor da espécie *Mus musculus* na ampliação de 1000x (original).



Figura 23 – Forma amastigota no exame parasitológico de fígado de roedor da espécie *Mus musculus* na ampliação de 1000x (original).

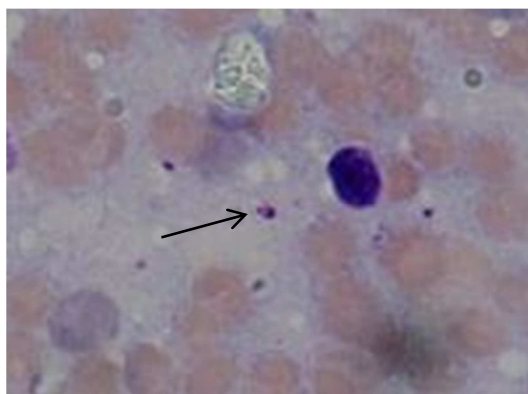
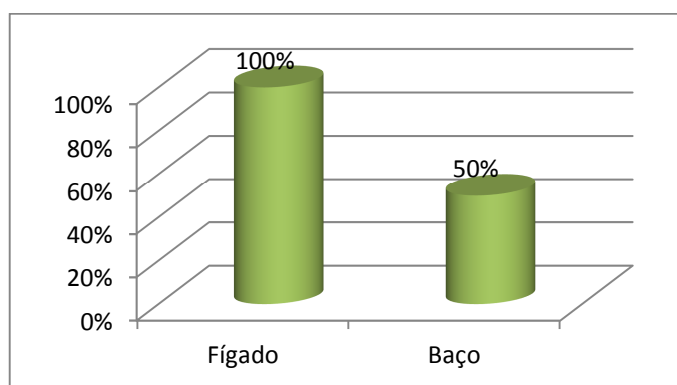


Gráfico 18 – Presença de formas amastigotas de *Leishmania* sp. no fígado e baço dos roedores positivos no exame parasitológico.



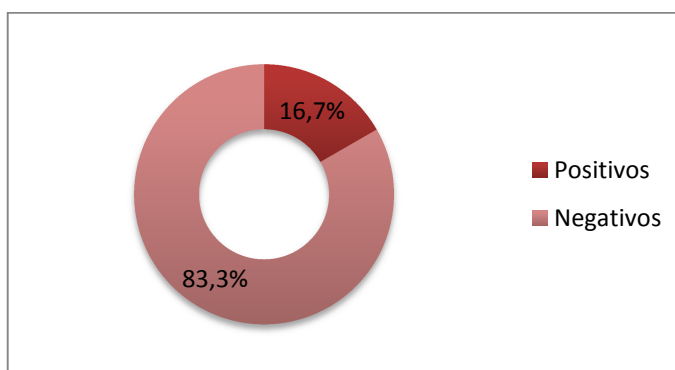
Apenas 2 dos 6 animais positivos no exame parasitológico apresentaram resultado positivo no teste molecular, enquanto 6 dos 9 animais positivos no teste molecular apresentaram resultado negativo no exame parasitológico.

6.3. Exame histopatológico

No exame histopatológico dos cortes corados com Giemsa não foram visualizadas quaisquer formas amastigotas nos órgãos dos animais testados.

No exame histopatológico dos cortes corados com Hematoxilina-eosina, 16,7% (n=5) das amostras observadas foram positivas (Gráfico 19).

Gráfico 19 - Taxa de infecção no exame histopatológico no total dos roedores testados.



Todos os animais positivos pertenciam à espécie *Mus musculus* (Gráfico 20). Apenas foram observadas formas amastigotas (Figura 24) em cortes histológicos de baço (Gráfico 21).

Gráfico 20 - Taxa de infecção por espécie no exame histopatológico.

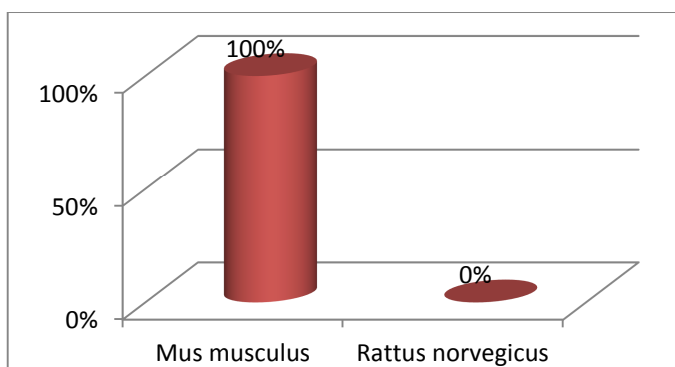


Figura 24 - Formas amastigotas no exame histopatológico de baço de roedor da espécie *Mus musculus* na ampliação de 1000x (original).

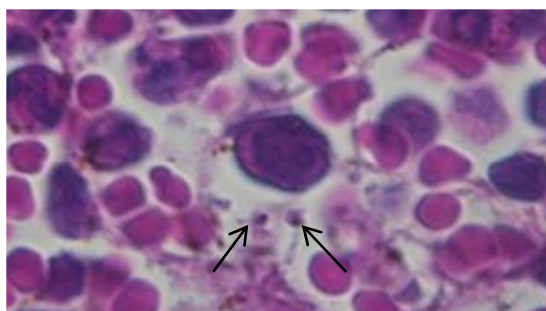
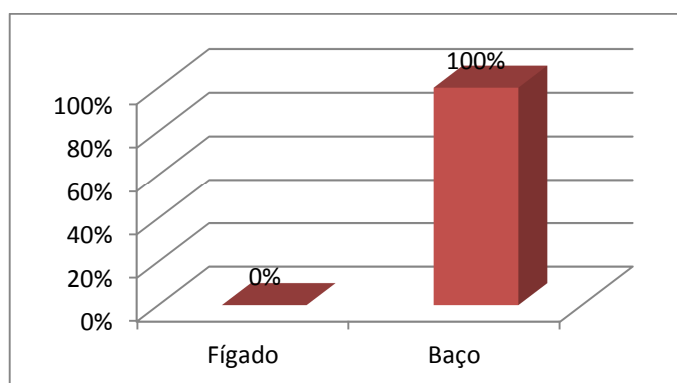
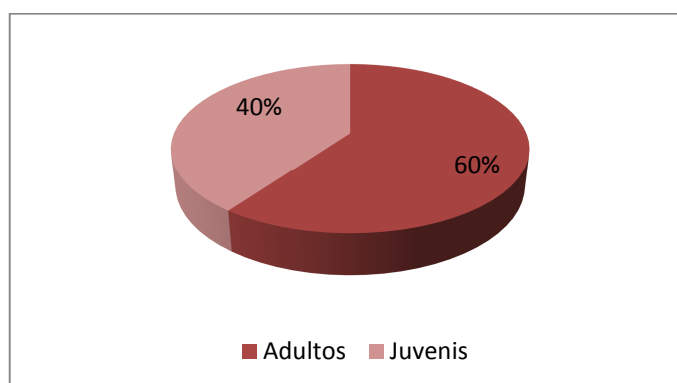


Gráfico 21 - Presença de *Leishmania* sp. no fígado e baço dos roedores positivos no exame histopatológico.



Do total de animais que revelaram infecção no exame histopatológico, 80% (n=4) foram positivos por RT-PCR enquanto 40% (n=2) foram positivos no exame parasitológico. Relativamente ao escalão etário, 60% eram adultos e 40% juvenis (Gráfico 22).

Gráfico 22 - Escalão etário dos roedores positivos no exame histopatológico.



6.4. Resultados globais

Dos 30 roedores estudados, apenas 1 animal foi positivo nos três métodos simultaneamente. Os resultados globais estão expressos na tabela 12.

Tabela 12 – Resultados globais da pesquisa de *Leishmania* sp. nos roedores das espécies *Rattus norvegicus* e *Mus Musculus* provenientes dos canis dos concelhos de Sintra e Sesimbra.

<u>Nº espécime</u>	<u>Espécie</u>	<u>Origem</u>	<u>Sexo</u>	<u>Idade</u>	<u>RT-PCR Pele</u>	<u>RT-PCR Baço</u>	<u>RT-PCR Fígado</u>	<u>Exame P. Fígado</u>	<u>Exame P. baço</u>	<u>H-P fígado</u>	<u>H-P baço</u>
1	<i>R.n.</i>	Sintra	F	A	N	N	-	N	N	N	N
2	<i>R.n.</i>	Sintra	M	A	Lesão cauda -	N	-	N	N	N	N
3	<i>R.n.</i>	Sintra	F	J	N	N	-	<u>P</u>	<u>P</u>	N	N
4	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	N	N	-	<u>P</u>	<u>P</u>	N	N
5	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	<u>P</u>	N	-	N	N	N	<u>P</u>
6	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	<u>P</u>	N	-	N	N	N	N
7	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	Lesão cauda -	N	-	N	N	N	N
8	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	J	N	N	-	<u>P</u>	N	N	N
9	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	N	N	N	N	N	N	N
10	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	<u>P</u>	N	N	N	N	N	<u>P</u>
11	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	N	N	N	N	N	N	N
12	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	N	N	N	N	N	N	N
13	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	<u>P</u>	N	N	N	N	N	N
14	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	N	N	N	N	N	N	N
15	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	N	N	N	N	N	N	N
16	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	N	N	N	N	N	N	N
17	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	N	N	N	<u>P</u>	N	N	<u>P</u>
18	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	N	N	N	N	N	N	N
19	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	<u>P</u>	N	N	<u>P</u>	<u>P</u>	N	N
20	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	N	N	N	N	N	N	N
21	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	N	N	N	N	N	N	N
22	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	N	N	N	N	N	N	N
23	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	N	N	N	N	N	N	N
24	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	<u>P</u>	N	N	N	N	N	N
25	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	N	N	N	N	N	N	N
26	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	N	N	N	N	N	N	N
27	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	<u>P</u>	N	N	N	N	N	<u>P</u>
28	<i>M.m.</i>	Sesimbra	F	A	N	N	N	N	N	N	N
29	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	J	<u>P</u>	N	-	N	N	N	N
30	<i>M.m.</i>	Sesimbra	M	A	<u>P</u>	N	-	<u>P</u>	N	N	<u>P</u>

Legenda: *R.n* – *Rattus norvegicus*; *M.m* – *Mus musculus*; A – adulto; J – juvenil; P – positivo; N - negativo; - não testado

7. Discussão

Ambas as espécies de roedores estudadas neste trabalho revelaram infecção por *Leishmania* sp.. Até à data, e apesar de não ter sido realizada a sequenciação de ADN para a confirmação

da presença do agente *Leishmania infantum*, nenhuma outra espécie foi referida em Portugal (Campino & Maia, 2010). Considera-se assim que há uma forte probabilidade dos roedores estarem infectados com o agente da leishmaniose visceral zoonótica.

O método de RT-PCR permitiu apurar uma taxa de infecção de 33,3% em 27 exemplares da espécie *Mus musculus*. Nenhum exemplar da espécie *Rattus norvegicus* apresentou resultado positivo por este método.

Todas as amostras positivas foram provenientes de pele de pavilhão auricular. Do total de roedores positivos diagnosticados pelo método de RT-PCR, a maioria eram adultos (77,7%). No entanto, não existem dados que permitam estabelecer uma relação entre o escalão etário e a incidência de infecção.

Neste trabalho, assim como em outros estudos de infecção natural e em ensaios experimentais, o pavilhão auricular dos roedores revelou-se como um local preferencial de alimentação para os flebotómíneos (Svobodová *et al.*, 2003; Melo, 2008; Júnior, 2010; Motazedian *et al.*, 2010; Parhizkari *et al.*, 2011).

Para as espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, Melo (2008) apurou pelo mesmo método uma percentagem de infecção no pavilhão auricular de 13,7% (n=3) e 11,1% (n=1) em amostragens de 22 e 9 animais, respectivamente. Contudo, não foi determinada a espécie de *Leishmania* envolvida. Ainda na pele de pavilhão auricular, Motazedian *et al.*, (2010) obteve também por PCR, uma positividade de 31,6% (n=18) para *Leishmania major* em 57 animais da espécie *Rattus norvegicus*.

O facto do pavilhão auricular constituir um local de alimentação por parte dos flebotómíneos, poderá significar uma eficácia acrescida na transmissão do agente devido à área diminuta, com pouco pêlo, ricamente vascularizada e facilmente acessível.

Svobodová *et al.*, (2003), apresentando dados de infecção experimental de *Leishmania tropica* em roedores da espécie *Rattus rattus*, referem que ocorreu uma persistência de ADN parasitário no pavilhão auricular durante o período máximo testado (24 meses). Referem ainda que, dos locais seleccionados para a inoculação experimental (pavilhão auricular e almofadas plantares), apenas os animais inoculados no pavilhão auricular transmitiram o agente aos flebotómíneos.

Apesar da elevada taxa de infecção presente neste tipo de amostra, em nenhum pavilhão auricular foram detectadas quaisquer lesões aquando do exame visual. Este dado é consistente com estudos realizados por diferentes autores (Svobodová *et al.*, 2003; Melo, 2008; Júnior, 2010; Motazedian *et al.*, 2010; Parhizkari *et al.*, 2011).

Em relação aos fragmentos de pele de cauda, apenas duas amostras provenientes de lesões suspeitas foram detectadas, colhidas e testadas. Ambas apresentaram resultado negativo, não

podendo ser consideradas significativas. Deverá ser realçado o facto de, na presença de lesões suspeitas na cauda, não terem sido testadas amostras de pele de pavilhão auricular devido a um limite fixo no número de amostras a testar. Este facto poderá ter levado a resultados falsos negativos no caso destes dois animais.

Em amostras de pele de cauda, no Brasil, Melo (2008) obteve 22,6% (n=5) de positividade em 22 roedores da espécie *Mus musculus* e 11,1% (n=1) em 9 *Rattus norvegicus*. À excepção de um animal, todos os outros demonstraram ausência de lesões. A única lesão observada foi testada e revelou-se negativa para *Leishmania* sp.. Motazedian *et al.*, (2010), no Irão, não obteve nenhum resultado positivo para *Leishmania major* em amostras de pele de cauda provenientes de 57 espécimes de *Rattus norvegicus*.

O resultado negativo por RT-PCR na totalidade das amostras de baço e de fígado poderá estar relacionado com inoculações parasitárias recentes, encontrando-se os animais em período pré-patente de infecção. Outra explicação plausível será a ocorrência de uma resposta imunitária eficiente com a consequente ausência de disseminação sistémica. Uma vez que as amostras testadas foram colhidas cerca de 6 horas após a morte dos animais, outra possibilidade será a ocorrência da degradação de ADN devido à rápida autólise que ocorre nestes órgãos após a morte. Parhizkari *et al.*, (2011) também não obtiveram resultados positivos por PCR nos mesmos órgãos de espécimes de *Mus musculus* infectados por *Leishmania major*. No entanto, Motazedian *et al.*, (2010) obtiveram positividade nas amostras de baço de *Rattus norvegicus* na percentagem de 8,8% (n=5) numa amostragem de 57 animais, também para *Leishmania major*. Em Belo Horizonte, no Brasil, Melo (2008) obteve resultados positivos para *Leishmania* spp. em PCR de baço e de fígado de *Mus musculus* com uma percentagem de 18,1% (n=4) e 28,6% (n=6) num universo de 22 e 21 animais, respectivamente.

O facto dos roedores da espécie *Rattus norvegicus* não terem apresentado resultado positivo em nenhuma das amostras de pele de pavilhão auricular ou de baço submetidas a RT-PCR, poderá ser devido a um diferente local de inoculação parasitária ou ausência de disseminação sistémica, respectivamente. Pode ainda ter ocorrido degradação de ADN.

A análise parasitológica revelou uma taxa de infecção total de 20% nos 30 roedores testados. A população de roedores da espécie *Mus musculus* apresentou uma taxa de infecção de 18,5% (5/27), enquanto na população de *Rattus norvegicus* o valor obtido foi de 33,3% (1/3). Estas percentagens podem ser consideradas elevadas comparativamente a estudos de outros autores em que não foram visualizadas formas amastigotas em qualquer uma das amostras de fígado ou baço de qualquer uma das espécies de roedores (Mohebbali *et al.*, 2004; Pourhohammadi *et al.*, 2008).

Do total de 6 animais infectados e diagnosticados pelo método parasitológico apenas dois apresentaram resultado positivo no diagnóstico por RT-PCR, enquanto quatro animais negativos a RT-PCR apresentaram resultado positivo. Esta discrepância pode estar relacionada com diferentes locais de inoculação parasitária. Para além do pavilhão auricular, estão descritos nas duas espécies, outros locais de alimentação por parte dos flebótomos. Com efeito, na espécie *Rattus norvegicus* estão descritas para além do pavilhão auricular, inoculações na cauda (Melo, 2008). Na espécie *Mus musculus* estão descritas inoculações na cauda e almofadas plantares (Parhizkari *et al.*, 2011).

A distribuição etária dos animais infectados e diagnosticados por análise parasitológica foi de 50% para adultos e 50% para juvenis. Mais uma vez não existem dados que permitam relacionar o escalão etário com a infecção por *Leishmania*.

Não foram detectadas quaisquer formas amastigotas nos cortes histológicos corados com Giemsa, provavelmente devido ao menor contraste parasita/célula. Nesse sentido, repetiu-se o exame histopatológico em cortes corados com Hematoxilina-eosina o que permitiu a visualização de formas amastigotas no baço de 16,6% (5/30) do total de roedores estudados. Esta repetição de exame histopatológico realizou-se apenas em amostras de fígado e de baço dos animais positivos nos exames por RT-PCR e exame parasitológico. Do total de cinco roedores da espécie *Mus musculus* positivos neste exame, quatro apresentaram resultado positivo em RT-PCR e dois apresentaram resultado positivo no exame parasitológico. O facto de apenas terem sido observadas formas amastigotas em cortes histológicos de baço pode ser justificado pelo elevado conteúdo celular susceptível à infecção por *Leishmania*.

Não ocorreu relação entre a carga parasitária encontrada no pavilhão auricular dos animais infectados e a disseminação sistémica do agente. Nos cinco exemplares com cargas parasitárias compreendidas entre as 50 e as 393 cópias de cinetoplasto de *Leishmania* spp., em três foram observadas formas amastigotas: um no exame parasitológico e dois no exame histopatológico. Os resultados não foram coincidentes. Os órgãos afectados foram no caso do animal positivo no exame parasitológico o fígado e o baço. A carga parasitária encontrada foi de 50 cópias. No caso dos animais positivos no exame histopatológico, o órgão afectado foi o baço e as cargas parasitárias encontradas foram de 72 e 100 cópias. Nos quatro animais que continham carga parasitária residual, ocorreu disseminação sistémica em dois. Este dado sugere uma imunidade eficiente em 44,5% dos animais positivos através de RT-PCR, como seja por exemplo, o animal positivo com uma carga parasitária de 393 cópias. Outra explicação plausível será a possibilidade de terem ocorrido picadas recentes por parte dos flebótomos com a consequente ausência de disseminação sistémica.

A presença de formas amastigotas nos órgãos testados dos animais positivos no exame parasitológico foi de 100% para o fígado e 50% para o baço. Este dado permite concluir que ocorreu disseminação sistêmica do agente. Gradoni *et al.*, (1983), num estudo de infecção experimental por *Leishmania infantum* na espécie *Rattus rattus* através de exame parasitológico, revelaram a diminuição da carga parasitária no baço ao longo do tempo com a ausência total de formas amastigotas a partir dos 20 dias até aos 5 meses pós-inoculação. Este dado poderá explicar a menor percentagem de animais infectados no baço em relação ao fígado.

Apesar de na espécie *Rattus norvegicus* o número de exemplares ser muito reduzido e não permitir conhecer as prevalências da infecção por *Leishmania* na população do albergue de Meleças, a população de *Mus musculus* por ser mais representativa, permitiu apurar prevalência de infecção de 30% (9/27) obtida por RT-PCR nos roedores do albergue de Sesimbra. Este valor foi superior às prevalências apuradas no Sul de Itália na região de Calábria e Ilha Sicília com 5,9% (1/17) (Di Bella *et al.*, 2003).

A detecção da infecção por *Leishmania* foi realizada durante o final da Primavera e Verão, o período de maior actividade dos flebótomos. Não existem em Portugal dados para comparação da relação da prevalência com a estação do ano. No entanto, dos estudos compilados neste trabalho, alguns autores apresentam resultados variáveis: Psaroulaki *et al.*, (2010) referem uma maior sero-prevalência apurada no Chipre durante o Verão relativamente às restantes estações (13,6% no Verão, 2,1% na Primavera, 5% no Outono e 0% no Inverno) enquanto Pourhammadi *et al.*, (2008) afirmam que no Irão a prevalência não se alterou significativamente ao longo das estações do ano. No Chipre o clima é temperado mediterrânico enquanto no Irão o clima é árido. Em Portugal, devido às suas semelhanças climáticas com Chipre, será de esperar uma prevalência superior no Verão em relação às restantes estações do ano.

É importante referir que o ambiente dos canis, para além de ser propício para a proliferação das populações de roedores com água, alimento e abrigo disponíveis, é também propício à proliferação dos flebótomos. Detritos orgânicos e fendas nas infra-estruturas proporcionam ambientes escuros com humidade adequada. Sharma & Singh, (2008), referem ainda as galerias dos roedores como locais favoráveis para os insectos.

O albergue de Meleças abriga 215 canídeos onde existem 5 (2,3%) com leishmaniose e sob tratamento, sendo utilizadas coleiras repelentes nestes animais. Desconhece-se o número de cães assintomáticos por ausência de rastreio total da população. O albergue de Sesimbra protege cerca de 230 canídeos onde 12 (5,2%) estão sob tratamento contra a leishmaniose

canina e igualmente protegidos por coleiras insecticidas. Assim como no albergue de Meleças, desconhece-se o número de cães assintomáticos.

Para um determinado mamífero poder ser considerado um hospedeiro reservatório, é necessário provar que o parasita depende desse animal para a sua manutenção num determinado foco. A WHO (1990) estabeleceu cinco critérios necessários para se poder incriminar uma determinada espécie como hospedeiro reservatório de *Leishmania*:

- 1) A espécie hospedeira deverá ser suficientemente abundante e deverá ter uma vida longa de forma a poder servir de alimento de forma significativa para o insecto vector;
- 2) Deverá ocorrer contacto abundante entre o insecto e o hospedeiro;
- 3) A proporção de espécimes que se infectam durante a sua vida deverá ser considerável e igual ou superior a 20%;
- 4) O curso da infecção no hospedeiro reservatório deverá ser longo e relativamente não patogénico e os parasitas deverão estar disponíveis na pele e no sangue em número suficiente para desencadear infecção nos flebotómíneos;
- 5) Os parasitas no hospedeiro reservatório deverão ser indistinguíveis dos parasitas presentes na espécie humana e uma identificação formal da espécie é necessária.

Os roedores das espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus* para além de serem altamente prolíficos, têm uma esperança média de vida de 12 e 24 meses respectivamente (Ministério da Saúde, 2002). Estes factos asseguram, à partida, a manutenção do agente no ambiente durante a época baixa de transmissão, pelo menos durante um ano. Aliando a esperança média de vida destes animais, à alta prolificidade, às altas prevalências apuradas em vários países (Neiva, 2005; Melo, 2008; Di Bella, 2003; Motazedian *et al.*, 2010; Parhizkari *et al.*, 2011) à sobre população e crescimento exponencial destes animais em condições de alimento, água e abrigo disponíveis, estes roedores constituem fortes candidatos a hospedeiros reservatórios para *Leishmania*. Com efeito, no universo de *Mus musculus* testados neste trabalho, a proporção de espécimes infectada corresponde a 33,3% (9/27), percentagem superior aos 20% referidos pela WHO (1990). Perante os resultados observados, não restam dúvidas acerca da ocorrência de contacto entre os flebotómíneos e os roedores. Adicionalmente, deverá ainda ser referido que o período de actividade dos flebótomos coincide com o período de maior actividade dos roedores.

A fraca presença de manifestações de doença de carácter geral e a ausência de lesões relacionadas com o agente, permite também concluir que a infecção por *Leishmania* spp. é relativamente não patogénica nestes animais. As evidências permitiram concluir que não ocorreram lesões visíveis decorrentes da inoculação de *Leishmania* no pavilhão auricular. Caso tenha ocorrido inoculação parasitária na cauda é possível que a mesma situação se

verifique, uma vez que as lesões na cauda dos dois roedores testados não continham ADN de *Leishmania*.

Em todos os estudos compilados ao longo deste trabalho, em apenas uma situação ocorreram manifestações de doença em roedores infectados por *Leishmania*: Canto-Lara *et al.*, (1999) referem ulceração, despigmentação, alopecia, edema e eritema na cauda de exemplares de *Sigmodon hispidus* e *Oryzomys melanotis* infectados com *Leishmania mexicana*. Referem ainda disseminação sistémica com envolvimento do fígado, baço e linfonodos e situações de metastização para a zona peri-anal, face posterior das coxas e pavilhão auricular. Assim como a espécie *Leishmania major*, a espécie *Leishmania mexicana* é responsável por manifestação de doença de carácter cutâneo em seres humanos. No entanto, mais estudos são necessários para estabelecer uma possível correlação com a espécie *Leishmania infantum*.

A identificação formal da espécie não foi efectuada neste trabalho. Apesar de não ter sido determinada a espécie de *Leishmania* implicada, admite-se que a infecção foi causada por *Leishmania infantum*, agente da leishmaniose canina zoonótica. Para além da sequenciação de ADN, não foram efectuadas culturas de *Leishmania* por condicionantes laboratoriais e económicas. Pelo facto dos roedores terem sido entregues mortos ao autor e em fase inicial de decomposição, contaminações recorrentes seriam prováveis, inviabilizando o método. Idealmente, conviria ter sido realizado exame imuno-histoquímico em conjugação com as técnicas utilizadas. Condicionantes económicas estiveram na base desta impossibilidade.

Em diferentes países do mundo, outras espécies de *Leishmania* zoonótica e antroponótica foram encontradas em várias espécies de roedores. No Brasil, espécimes de *Orizomys subflavus* apresentaram infecção por *Leishmania braziliensis*, *Thricomys apereoides* por *Leishmania mexicana* e *Rattus rattus* por *Leishmania chagasi* e *Leishmania mexicana* (Oliveira *et al.*, 2005). No México, Canto-Lara *et al.*, (1999) apresentaram resultados de espécimes de *Ototylomys phyllotis*, *Oryzomys melanotis*, *Peromyscus yucatanicus* e *Sigmodon hispidus* infectados com *Leishmania mexicana*. Na Venezuela, Zulueta *et al.*, (2002) demonstraram infecção pela espécie antroponótica *Leishmania donovani*, responsável pela leishmaniose visceral humana, num exemplar de *Rattus rattus*. A mesma espécie de *Leishmania* foi encontrada no Irão num espécime de *Meriones persicus* (Mohebbali *et al.*, 2004). Ainda no mesmo país, diferentes estudos permitiram apurar infecções por *Leishmania major* em roedores das espécies *Rhombomys opimus*, *Nesokia indica* e *Rattus norvegicus* (Mohebbali *et al.*, 2005; Pourhammadi *et al.*, 2008). Foram ainda apresentados casos de co-infecção de *Leishmania major* e *Leishmania turanica*, casos de co-infecção de *Leishmania major* e *Leishmania gerbilli* e casos de co-infecção das três espécies em roedores da espécie *Rhombomys opimus* (Akhavan *et al.*, 2010).

Em condições experimentais, Gradoni *et al.*, (1983) demonstraram uma elevada susceptibilidade à infecção por *Leishmania infantum* por parte dos flebótomos da espécie *Phlebotomus perniciosus*, após se terem alimentado de dois roedores: um com elevada carga parasitária e outro com infecção sub-patente e com imunossupressão induzida por administração farmacológica. Apresentaram também evidências de ocorrer uma atracção dos flebótomos aos roedores da espécie *Rattus rattus* em condições naturais. Dois anos mais tarde, Pozio *et al.*, (1985) trabalhando com a mesma espécie de roedores e flebótomos, verificaram que bastou a picada de dois insectos para induzir infecção por *Leishmania infantum* num roedor, que por sua vez se tornou infectante 6 meses mais tarde. Ainda na espécie *Rattus rattus*, Svobodová *et al.*, (2003) verificaram a existência de parasitas de *Leishmania tropica* viáveis no pavilhão auricular dos animais até 24 meses pós-inoculação. Estes induziram infecção em insectos flebótomos da espécie *Phlebotomus sergenti* no período entre 1 e 24 meses pós-infecção. Os autores verificaram que os roedores desta espécie são hospedeiros viáveis para esta espécie de *Leishmania*, podendo eventualmente participar no ciclo de transmissão da leishmaniose cutânea antroponótica.

Nas espécies *Mus musculus* e *Rattus norvegicus*, ensaios experimentais utilizando amostras biológicas positivas deveriam ser efectuados de forma a verificar o índice de infecciosidade.

8. Conclusão

O estudo realizado nos 30 roedores provenientes dos dois albergues veio incrementar o conhecimento acerca de hospedeiros reservatórios de *Leishmania infantum* em Portugal. A infecção nestes animais foi reportada pela primeira vez nos concelhos de Sintra e Sesimbra. Através do método de RT-PCR, 33,3% (9/27) dos espécimes de *Mus musculus* revelaram positividade, enquanto no exame parasitológico e histopatológico, a taxa de infecção foi de 18,5% (5/27). Para a espécie *Rattus norvegicus*, através de exame parasitológico, a taxa de infecção apurada foi de 33,3% (1/3).

Dos 30 roedores estudados, apenas um foi positivo pelos três métodos em simultâneo.

Ambas as populações estudadas poderão agir como hospedeiros reservatórios e aumentar as probabilidades de disseminação do parasita aos vectores, aumentando o risco de infecção nas populações de canídeos e seres humanos. São animais susceptíveis à infecção por *Leishmania infantum* e significam assim, um risco acrescido não só de propagação do agente mas também para a manutenção da endemia de leishmaniose canina. Existem em Portugal inúmeras populações de roedores em ambiente peri-domiciliar e intra-domiciliar, em risco de albergar e eventualmente transmitir o agente aos flebótomos.

Estudos complementares de infecção natural envolvendo amostragens maiores, diferentes testes diagnósticos e diferentes populações são necessários para melhor caracterizar o nível de infecção nos roedores em Portugal. Perante os resultados obtidos neste trabalho e tendo em consideração os estudos aqui apresentados, medidas eficientes de controlo de roedores devem ser instituídas, implementadas e incluídas numa estratégia global de controlo da leishmaniose canina e humana.

Bibliografia

- Afonso, M. & Alves-Pires, C. (2008). Capítulo II: Bioecologia dos vectores. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 27-40.
- Akhavan, A., Mirhendi, H., Khamesipour, A., Alimohammadian, M., Rassi, Y., Bates, P., Kamhawi, S., Valenzuela, J., Arandian, M., Abdoli, H., Jalali-zand, N., Jafari, R., Shareghi, N., Ghanei, M. & Yaghoobi-Ershadi, M. (2010). *Leishmania* species: Detection and identification by nested PCR assay from skin samples of rodent reservoirs: Exp Parasitol. 2010 December; 126(4): 552–556.
- Alencar, J., Pessoa, E. & Fontenele, Z. (1960). Infecção natural de *Rattus rattus alexandrinus* por *Leishmania* (provavelmente *L. Braziliensis*) em zona endémica de leishmaniose tegumentar no estado do Ceará, Brasil. Rev. inst. Med trop. São Paulo 2(6):347-348, Novembro-Dezembro 1960.
- Alexander, B., Carvalho, RL., McCallum, H. & Pereira, M.H. (2002). Role of the domestic chicken (*Gallus gallus*) in the epidemiology of urban visceral leishmaniasis in Brazil. Emerg Infect Dis 2002 Dec; 8.
- Alexandre-Pires, G.M. & Correia, J.J. (2008). Capítulo IV: Patogenia e lesões da leishmaniose canina. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 53-68.
- Alves, C., Cortes, L., Reginaldo, P. (2010). The vectorial potential of *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *intermedia* and *Lutzomyia* (*N.*) *whitmani* in the transmission of *Leishmania* (*V.*) *braziliensis* can also be related to proteins attaching. J Biomed Biotechnol. 2010; 2010: 827851.
- Beheshti, M., Ghotbi, S.H. & Amirizade, S. (2007). Therapeutic and adverse effects of glucantime used for treatment of cutaneous leishmaniasis. Shiraz E-Medical Journal Vol. 8, No.4, October 2007.
- Bray, D.P., Bandi, K.K., Brazil, R.P., Oliveira, A.G. & Hamilton, J.G. (2009). Synthetic sex pheromone attracts the leishmaniasis vector *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae) to traps in the field. J. Med. Entomol. 2009 May;46(3):428-34 – [Abstract]. Acedido em Março, 22, 2011, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19496409>
- Campino, L. & Maia, C. (2010). Epidemiologia das leishmanioses em Portugal. Acta Med Port 2010; 23: 859-864.
- Canto-Lara, S., Wynsberghe, N., Vargas-González, A., Ojeda-Farfán, F. & Andrade-Narváez, F. (1999). Use of monoclonal antibodies for the identification of *Leishmania* spp. isolated from humans and wild rodents in the State of Campeche, México. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94(3): 305-309, May/Jun. 1999.
- Carvalho, A.C. (2009). *Climas de mudança: Vulnerabilidade humana às alterações climáticas no concelho de Sintra*. Dissertação de Mestrado em Ecologia Humana e Problemas Sociais Contemporâneos. Faculdade de Ciências Sociais e Humanas – Universidade Nova de Lisboa, pp. 84-88.

- Center for Food Security and Public Health, Institute for International Cooperation in Animal Biologics & OIE. (2009). Leishmaniasis (cutaneous and visceral).
- Cerqueira, E., Sherlock, I., Gusmão, A., Júnior, A. & Nakatani, M. (2003). Inoculação experimental de *Equus asinus* com *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.36 no.6 Uberaba Nov./Dec. 2003.
- Charmoi, M., Auderset, F., Allebach, C., & Tacchini-cottier, F. (2010). The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. Biomed Biotechnol. 2010; 2010: 719361.
- Coelho, W., Lima, V., Amarante, A., Langoni, H., Pereira, V., Abdelnour, A. & Bresciani, A. (2010) Occurrence of *Leishmania (Leishmania) chagasi* in a domestic cat (*Felis catus*) in Andradina, São Paulo, Brazil: case report. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 256-258, out.-dez. 2010.
- Colombo, F.A., Odorizzi, R.M., Laurenti, M.D., Galati, E.A., Canavez, F. & Pereira-Chiocola, V.L. (2011). Detection of *Leishmania (Leishmania) infantum* RNA in fleas and ticks collected from naturally infected dogs. Parasitology research 2011, Jan 11.
- Comissão Municipal de Defesa Contra Incêndios de Palmela, Setúbal e Sesimbra, (2007). Plano intermunicipal de defesa da floresta contra incêndios dos concelhos de Palmela, Setúbal e Sesimbra. Caderno II – Informação de base, pp. 7-22.
- Courtenay, O., Quinnell, R., Garcez, L.M., Shaw J. & Dye, C. (2002). Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission. The Journal of Infectious Diseases 2002;186:1314–20.
- Dantas-Torres, F. & Brandão-Filho, S. (2006). Visceral leishmaniasis in Brazil: revisiting paradigms of epidemiology and control. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo vol.48 no.3 São Paulo May/June 2006.
- De Lima, H., De Guglielmo, Z., Rodríguez, A., Convit, J. & Rodriguez, N. (2002). Cotton rats (*Sigmodon hispidus*) and black rats (*Rattus rattus*) as possible reservoirs of *Leishmania* spp. In Lara state, Venezuela. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(2): 169-174, March 2002.
- Di Bella, C., Vitale, F., Russo, G., Greco, A., Milazzo, C., Aloise, G. & Cagnin, M. (2003). Are rodents a potential reservoir for *Leishmania infantum* in Italy? J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 125 – 129.
- Diniz, L., Duani, H., Freitas, C., Figueiredo, R. & Xavier, C. (2010) Neurological involvement in visceral leishmaniasis: case report. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. vol.43 no.6 Uberaba Nov./Dec. 2010.
- Dujardin, J.C., Campino, L., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Soteriadou, K., Mazeris, A., Ozbek, Y. & Boelaert, M. (2008). Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. Emerg Infect Dis. 2008 July; 14(7): 1013–1018.
- European Medicines Agency, (2011). CaniLeish – Summary of opinion. EMA/CVMP/296014/2010. Acedido em: Março 28, 2011, disponível em:

- Ezra, N., Ochoa, M. & Craft, N. (2010). Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2010 Sep–Dec; 2(3): 248–257.
- Fernández-Bellon, H., Solano-Gallego, L., Bardagi, M., Alberola, J., Ramis, A. & Ferrer, L. (2006). Immune response to *Leishmania infantum* in healthy horses in Spain. *Veterinary Parasitology* volume 135, Issue 2, 30 January.
- Gavgani, A.S., Hodjati, M.H., Mohite, H. & Davies, C.R. (2002). Effect of insecticide-impregnated dog collars on incidence of zoonotic visceral leishmaniasis in Iranian children: a matched-cluster randomised trial. *Lancet* 2002; 360: 374–79.
- Gradoni, L., Pozio, E., Gramiccia, M., Maroli, M. & Bettini, S. (1983). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): VII. Studies on the role of the black rat, *Rattus rattus*, in the epidemiology of visceral leishmaniasis. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, Vol. 77, No. 4, 427-431 (1983).
- Gramiccia, M. & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniasis and approaches to disease control. *International Journal for Parasitology* 35 (2005) 1169–1180.
- Guimarães, F., Azevedo, M. & Damasceno, R. (1968). Leishmaniose tegumentar – Zoonose de roedores silvestres na Amazônia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 66(2), 1968.
- Hepburn, N.C. (2003) Cutaneous leishmaniasis: an overview. *J Postgrad Med* [serial online] 2003; 49:50.
- Júnior, J. (2010). Infecção natural por *Leishmania* spp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos envolvidos na manutenção da leishmaniose tegumentar americana em área endêmica da Zona da Mata Norte de Pernambuco, Brasil. *Dissertação de Mestrado em Saúde Pública*. Fundação Oswaldo Cruz, pp. 36-56.
- Kumar, P., Sharma, P.K., Jain, R.K., Gautam, R.K., Bhardwaj, M. & Kar, H.K. (2007). Oral ulcer as an unusual feature of visceral leishmaniasis in an AIDS patient. *Indian J Med Sci* [serial online] 2007; 61:97-101.
- Lima, H., Rodriguez, N., Barrios, M., Ávila, A., Cañizales, I. & Gutiérrez, S. (2008). Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.103 no.4 Rio de Janeiro June 2008.
- Maia, C., Nunes, M., & Campino, L. (2008). Importance of cats in zoonotic leishmaniasis in Portugal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. August 2008, 8(4): 555-560. doi:10.1089/vbz.2007.0247. [Abstract].
- Martin-Sanchez, J., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Ludovisi, A. & Morillas-Márquez, F. (2004). Isoenzymatic polymorphism of *Leishmania infantum* in southern Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* (2004) 98, 228-232. doi:10.1016/S0035-9203(03)00060-9.

- Melo, L. (2008). Detecção de *Leishmania* sp. em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos no município de Belo Horizonte, MG. Dissertação de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Centro de pesquisas René Rachou. Fundação Oswaldo Cruz, pp. 44-72.
- Ministério da Saúde (2002). Manual de Controle de Roedores - vigilância Epidemiológica. Brasília: Funasa.
- Mohebbali, M., Javadian, E., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Akhavan, A.A., Hajjaran, H. & Abaei, M.R. (2004). Characterization of *Leishmania* infection in rodents from endemic areas of the Islamic Republic of Iran. Eastern Mediterranean Health Journal, Vol. 10, Nos 4/5, 2004.
- Molina, R., Grandoni, L. & Alvar, J. (2003). HIV and the transmission of *Leishmania*. Annals of Tropical Medicine & Parasitology, Vol. 97, Supplement No. 1, S29–S45 (2003).
- Moreno, J. & Alvar, J. (2002). Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. TRENDS in Parasitology Vol.18 No.9 September 2002.
- Motazedian, M., Parhizkari, M., Mehrabani, D., Hatam, G. & Asgari, Q. (2010). First detection of *Leishmania major* in *Rattus norvegicus* from Fars Province, Southern Iran. Vector-Borne and Zoonotic Diseases. December 2010, 10(10): 969-975. doi:10.1089/vbz.2008.0214.
- Neiva, H. (2005). Frequência de anticorpos de *Leishmania* sp. em *Rattus norvegicus* no município de Belo Horizonte, Minas Gerais. Dissertação de Mestrado em epidemiologia. Escola de veterinária – Universidade Federal de Minas Gerais, Brasil, pp. 18-23.
- Oliveira, F., Pirmez, C., Pires, M., Brazil, R. & Pacheco, R. (2005). PCR-based diagnosis for detection of *Leishmania* in skin and blood of rodents from an endemic area of cutaneous and visceral leishmaniasis in Brazil. Veterinary Parasitology 129 (2005) 219-227.
- Observatório Nacional das Leishmanioses. (2009). “A Semana da Leishmaniose”. Resultados preliminares. Acedido em Março, 23, 2011, disponível em: http://www.onleish.org/media/files/articles/A_Semana_da_Leishmaniose_resultados_preliminares.pdf
- Papadogiannakis, E., Spanakos, G., Kontos, V., Menounos, P.G., Tegos, N. & Vakalis, N. (2009). Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. Zoonoses Public Health. 57 (2010) e23–e25.
- Parhizkari, M., Motazedian, M.H., Asgari, Q. & Mehrabani, D. (2011). The PCR-based detection of *Leishmania major* in *Mus musculus* and other rodents caught in Southern Iran: A guide to sample selection. Annals of tropical medicine & Parasitology, Vol. 105, No. 4, 319-323 (2011).
- Pereira, A. (2003). Geografia física e ambiente III: Diversidade do meio físico e recursos naturais. Atlas da área metropolitana de Lisboa. Atlas da área metropolitana de Lisboa, ISBN:972-98655-7-4, pp. 47-48, 56-57, 60-67.
- Pimenta, P., Saraiva, E., Rowton, E., Modi, G., Garraway, L., Beverley, S., Turco, S. & Sacks, D. (1994). Evidence that the vectorial competence of phlebotomine sand flies for different species of *Leishmania* is controlled by structural polymorphisms in the surface lipophosphoglycan. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 September 13; 91(19): 9155–9159.

- Pimenta, P., Modi, G., Pereira, S., Shahabuddin, M. & Sacks, D. (1997). A novel role for the peritrophic matrix in protecting *Leishmania* from the hydrolytic activities of the sand fly midgut. *Parasitology*. 1997 Oct;115 (Pt 4):359-69.
- Pourhohammadi, B., Motazedian, M.H. & Kalantari, M. (2008). Rodent infection with *Leishmania* in a new focus of human cutaneous leishmaniasis, in northern Iran. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, Vol. 102, No. 2, 127-133 (2008).
- Pozio, E., Maroli, M., Gradoni, L. & Gramiccia, M. (1985). Laboratory transmission of *Leishmania infantum* to *Rattus rattus* by the bite of experimentally infected *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene* (1985) 79, 524-526.
- Psaroulaki, A., Antoniou, M., Toumazos, P., Mazeris, A., Ioannou, I., Chochlakis, D., Christophi, N., Loukaides, P., Patsias, A., Moschandrea, I. & Tselentis, Y. (2010). Rats as indicators of the presence and dispersal of six zoonotic microbial agents in Cyprus, an island ecosystem: a seroepidemiological study. *Trans R Soc Trop Med Hyg* (2010), doi:10.1016/j.trstmh.2010.08.005.
- Rangel, E. & Lainson, R. (2009). Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 937-954.
- Ready, P. D. (2010). Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill*. 2010;15(10).
- Rolão, N. (2004). O parasitismo e a resposta imunitária local em murganhos BALB/c infectados por *Leishmania infantum*. Dissertação Doutorado em Ciências Biomédicas, especialidade de Parasitologia, pela Universidade Nova de Lisboa - Instituto de Higiene e Medicina Tropical, pp. 3-12.
- Rolão, N., Martins, M.J., João, A. & Campino, L. (2005). Equine infection with *Leishmania* in Portugal. *Parasite*, 2005, 12, 183-186.
- Sádlová, J. & Volf, P. (2009). Peritrophic matrix of *Phlebotomus duboscqi* and its kinetics during *Leishmania major* development. *mCell Tissue Res* (2009) 337:313–325.
- Sant'Anna, M., Nascimento, A., Alexander, B., Dilger, E., Cavalcante, R., Hector, M., Diaz-Albiter, H., Bates, P. & Dillon, R. (2010). Chicken blood provides a suitable meal for the sand fly *Lutzomyia longipalpis* and does not inhibit *Leishmania* development in the gut. *Parasit Vectors*. 2010; 3: 3.
- Sharma, U. & Singh, S. (2008). Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45, December 2008, pp. 255–272.
- Shaw, J. J. (1994). Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 471-478.
- Silva, L.J. & Camargo-Neves, V.L. (2004). As Leishmanioses, uma visão para o clínico. *Prática Hospitalar*. Ano VI, nº 36, Nov-Dez/2004.
- Solano-Gallego, L., Miró, G., Koutinas, A., Cardoso, L., Pennisi, M.G., Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G. & Baneth, G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasite & Vectors*. 2011; 4: 86.

- Svobodová, M., Votýpka, J., Nicolas, L. & Volf, P. (2003). *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*. *Microbes and infection* 5 (2003) 361-364.
- Tomás, A.M. & Romão, S.F. (2008). Capítulo I: Bioecologia do parasita. In Santos-Gomes, G. M., Pereira da Fonseca, I. M. (Eds.). *Leishmaniose Canina*. Lisboa: Chaves Ferreira – Publicações, S.A., 2008, pp. 7-26.
- Vedovello, D., Jorge, F.A., Lonardoni, M.V., Teodoro, U. & Silveira, T.G. (2008). American cutaneous leishmaniasis in horses from endemic areas in the north-central mesoregion of Paraná state, Brazil. *Zoonoses Public Health*. 2008 Apr;55(3):149-55.
- Virbac, (2011). Canileish: A primeira vacina na Europa contra a leishmaniose. *Notícias Leishmaniose / Número 1 / Edição Portugal*.
- Weina, P. (2009). Dermatological manifestations of leishmaniasis. Acedido em Abril 1, 2011, disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/1108860-overview>
- WHO. (1990). Control of the leishmaniasis, WHO technical report series 793.
- WHO. (2010). Sixty-third World Assembly. Provisional agenda item 11.13.
- Wilson, R., Bates, M., Dostalova, A., Jecna, L., Dillon, R., Volf, P., & Bates, P. (2010). Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010 September; 4(9): e816.
- Wynsberghe, N., Canto-Lara, S., Damián-Centeno, A., Itzá-Ortiz, M. & Andrade-Narváez, F. (2000). Retention of *Leishmania (Leishmania) mexicana* in naturally infected rodents from the State of Campeche, Mexico. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 95(5): 595-600, Sep./Oct. 2000.
- Zilstra, E.E., Musa, A.M., Khalil, E.A., El-hassan, I.M. & El-hassan, AM. (2003). Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet. Infect Dis*. 2003 Feb;3(2):87-98.
- Zulueta, A., Villarroel, E., Rodriguez, N., Feliciangeli, M., Mazarri, M., Reyes, O., Rodriguez, V., Centeno, M., Barrios, R. & Ulrich, M. (1999). Epidemiological aspects of american visceral leishmaniasis in an endemic focus in eastern Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 61(6), 1999, pp. 945–950.

Anexo 1 – Resultados totais do estudo epidemiológico efectuado no Chipre.

		Total	<i>R.</i>	Total	<i>R.</i>	Total	<i>B.</i>	<i>C.</i>	<i>T.</i>
		testados	<i>typhi</i> (%)	testados	<i>conorii</i> (%)	testados	<i>henselae</i> (%)	<i>burnetti</i> (%)	<i>gondii</i> (%)
Espécie	<i>R. rattus</i>	152	32 (21,1%)	153	83 (54,2%)	152	21 (13,8%)	19 (12,5%)	41 (27%)
	<i>R. norvegicus</i>	344	209 (60,8%)	347	126 (36,3%)	342	31 (9,1%)	44 (12,9%)	97 (28,4%)
Localidade	Nicosia	153	58 (37,9%)	157	55 (35%)	151	7 (4,6%)	8 (5,3%)	16 (10,6%)
	Famagusta	22	18 (81,8%)	22	14 (63,6%)	22	4 (18,2%)	3 (13,6%)	4 (18,2%)
	Larnaca	175	134 (76,6%)	175	67 (38,3%)	175	21 (12%)	33 (18,9%)	80 (45,7%)
	Limassol	105	24 (22,9%)	105	53 (50,5%)	105	18 (17,1%)	15 (14,3%)	31 (29,5%)
	Paphos	41	7 (17,1%)	41	20 (48,8%)	41	2 (4,9%)	4 (9,8%)	7 (17,1%)
	Primavera	98	37 (37,8%)	102	62 (60,8%)	96	10 (10,4%)	10 (10,5%)	10 (10,5%)
	Verão	184	95 (51,6%)	184	92 (50%)	184	27 (14,7%)	30 (16,3%)	77 (41,8%)
Estação do ano	Outono	180	104 (57,8%)	180	44 (24,4%)	180	11 (6,1%)	18 (10%)	49 (27,2%)
	Inverno	34	5 (14,7%)	34	11 (32,4%)	34	4 (11,8%)	5 (14,7%)	2 (5,9%)

Anexo 2 – Dados biométricos dos roedores estudados.

Nº do exemplar	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Espécie	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>R. norvegicus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>
Proveniência	Sintra	Sintra	Sintra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra
Sexo (Macho, Fêmea)	F	M	F	F	M	M	M	F	F	M
Peso (g)	334	419	66	23	22	22	25	18	15	11
Comprimento do corpo (cm)	31	42	22	14,5	15,5	15,5	17	14,5	13	13
Comprimento da cabeça (cm)	5,5	5,5	4,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Comprimento do P. auricular (cm)	2	2	1,5	1	1	1	1	1	1	1
Comprimento da cauda (cm)	18	21	10	8	8	8	9	7,5	7	7
Idade (Infantil, Juvenil, Adulto, Senior)	A	A	J	A	A	A	A	J	A	J

Anexo 2 (continuação)

Nº do exemplar	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Espécie	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>
Proveniência	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra
Sexo (Macho, Fêmea)	M	M	F	F	F	M	M	M	M	M
Peso (g)	17	11	18	22	24	14	12	16	19	15
Comprimento do corpo (cm)	14	12	13	16	15	12	12	13	14	13
Comprimento da cabeça (cm)	2,5	1,5	2	2	2,5	2	2	2	2	2
Comprimento do P. auricular (cm)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Comprimento da cauda (cm)	7	7	7,5	8	8	7	7	8	7,5	6,5
Idade (Infantil, Juvenil, Adulto, Senior)	A	J	A	A	A	J	J	A	A	J

Anexo 2 (continuação)

Nº do exemplar	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Espécie	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>	<i>M. musculus</i>
Proveniência	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra	Sesimbra
Sexo (Macho, Fêmea)	F	M	M	F	M	M	M	F	M	M
Peso (g)	22	15	25	22	11	9	19	30	20	26
Comprimento do corpo (cm)	15	13	16	16	12	11	15	14,5	13,5	16
Comprimento da cabeça (cm)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Comprimento do P. auricular (cm)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Comprimento da cauda (cm)	8	7	8	8,5	7	6,5	8,5	8	7,5	9
Idade (Infantil, Juvenil, Adulto, Senior)	A	J	A	A	J	J	A	A	J	A

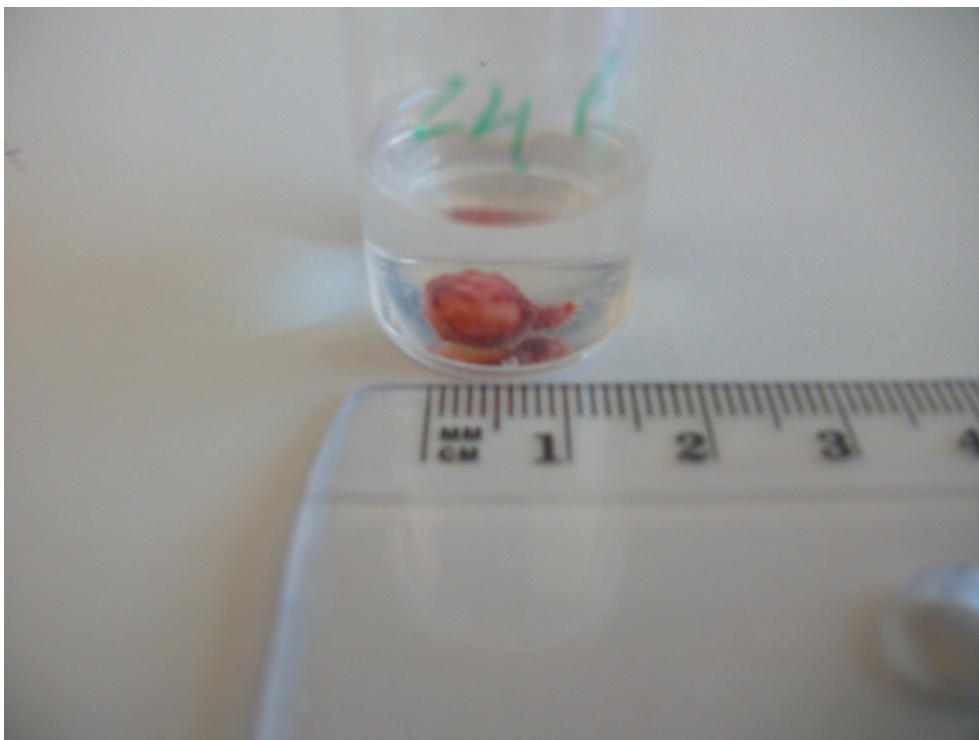
Anexo 3 – Alterações orgânicas detectadas nos roedores estudados.

<u>Nº Espécime</u>	<u>Pele</u>	<u>Fígado</u>	<u>Baco</u>	<u>Outros</u>
1	-	-	-	-
2	Lesão cauda	-	-	Ulceração peritoneal (figura 3a)
3	-	-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	Lesão cauda	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	Quisto (figura 3b)	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-

Figura 3a - Ulceração peritoneal num espécime de *Rattus norvegicus* (original).



Figura 3b - Quisto hepático num espécime de *Mus musculus* (original).



Anexo 4 – Quantificação de ADN das amostras submetidas a RT-PCR.

Orgão/Nº amostra	Quantidade de ADN (ng/µl)
Pele 1	265,2 ng/µl
Pele 2	43,1 ng/µl
Pele 3	100,7 ng/µl
Pele 4	56,8 ng/µl
Pele 5	71,9 ng/µl
Pele 6	54,6 ng/µl
Pele 7	53,3 ng/µl
Pele 8	41,5 ng/µl
Pele 9	207,5 ng/µl
Pele 10	65,4 ng/µl
Pele 11	116,2 ng/µl
Pele 12	54,3 ng/µl
Pele 13	44,9 ng/µl
Pele 14	43,7 ng/µl
Pele 15	47,4 ng/µl
Pele 16	29,5 ng/µl
Pele 17	25,7 ng/µl
Pele 18	36,4 ng/µl
Pele 19	29,9 ng/µl
Pele 20	43,6 ng/µl
Pele 21	38,8 ng/µl
Pele 22	57 ng/µl
Pele 23	30,7 ng/µl
Pele 24	33,4 ng/µl
Pele 25	42,4 ng/µl
Pele 26	57,7 ng/µl
Pele 27	45,8 ng/µl
Pele 28	31 ng/µl
Pele 29	30,5 ng/µl
Pele 30	42,8 ng/µl

Anexo 4 (continuação)

Orgão/Nº amostra	Quantificação de ADN (ng/μl)
Baço 1	100,3 ng/μl
Baço 2	53,4 ng/μl
Baço 3	160,2 ng/μl
Baço 4	575,6 ng/μl
Baço 5	193,2 ng/μl
Baço 6	331,6 ng/μl
Baço 7	300,4 ng/μl
Baço 8	391,4 ng/μl
Baço 9	64,3 ng/μl
Baço 10	157,9 ng/μl
Baço 11	245,7 ng/μl
Baço 12	145,3 ng/μl
Baço 13	280,2 ng/μl
Baço 14	115,3 ng/μl
Baço 15	123,1 ng/μl
Baço 16	49,2 ng/μl
Baço 17	59 ng/μl
Baço 18	474,7 ng/μl
Baço 19	613,1 ng/μl
Baço 20	562,5 ng/μl
Baço 21	250,6 ng/μl
Baço 22	102,7 ng/μl
Baço 23	360,4 ng/μl
Baço 24	391,8 ng/μl
Baço 25	155,1 ng/μl
Baço 26	275,8 ng/μl
Baço 27	507,7 ng/μl
Baço 28	183,4 ng/μl
Baço 29	286,9 ng/μl
Baço 30	695,5 ng/μl

Anexo 4 (continuação)

Orgão/Nº amostra	Quantificação de ADN (ng/µl)
Fígado 9	501,7 ng/µl
Fígado 10	285,3 ng/µl
Fígado 11	292,2 ng/µl
Fígado 12	164,2 ng/µl
Fígado 13	195,9 ng/µl
Fígado 14	219,7 ng/µl
Fígado 15	200,4 ng/µl
Fígado 16	169,1 ng/µl
Fígado 17	398 ng/µl
Fígado 18	180,7 ng/µl
Fígado 19	144,1 ng/µl
Fígado 20	362,2 ng/µl
Fígado 21	122,8 ng/µl
Fígado 22	205,7 ng/µl
Fígado 23	333,4 ng/µl
Fígado 24	109,2 ng/µl
Fígado 25	125,7 ng/µl
Fígado 26	134,1 ng/µl
Fígado 27	225,7 ng/µl
Fígado 28	178,4 ng/µl